

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE KINETIK
DER SPALTUNG VON SERINPEPTIDEN

Ein Beitrag zum Problem der
Reaktivität des Serins



Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

Vorgelegt von
Joachim Heidberg
aus Breslau

1961

1961



Gedruckt mit Genehmigung der
Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

Dekan: Prof. Dr. K. Egle

1. Gutachter (Referent): Prof. Dr. H. Hartmann
2. Gutachter (Korreferent): Prof. Dr. Th. Wieland

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Februar 1962

Tag der Promotion: 28. Februar 1962

Meinen Eltern

in Dankbarkeit zugeweiht.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. H. Hartmann, bin ich für das stete Interesse und die großzügige Förderung, welche er der vorliegenden Arbeit entgegenbrachte, zu tiefem Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. Th. Wieland schulde ich aufrichtigen Dank für wertvolle Ratschläge zur Darstellung und Trennung der Peptide.

Frau Dr. Ilse habe ich für zahlreiche Anregungen, die sie mir auf radiochemischem Gebiet zuteil werden ließ, besonders zu danken, ebenso Herrn Priv.-Doz. Dr. H.L. Schläfer für die Überlassung des Titrigraphen.

Mein herzlicher Dank gebührt der Studienstiftung des Deutschen Volkes für die Gewährung eines Stipendiums und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die materielle Unterstützung der Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Literaturverzeichnis	8
I. Problemstellung und Aufbau der Arbeit	11
Erster Teil	
<u>Untersuchung der Reaktionen in saurer Lösung</u>	
II. Hydrolyse des DL-Alanyl-DL-serins in saurer Lösung	14
1. Synthese des ^{14}C -DL-Alanyl-DL-serins	14
2. Kinetische Messungen	16
a. Durchführung der Hydrolyse	17
b. Zonelektrophoretische und papierchromato- graphische Trennung der Hydrolysate	18
c. Aktivitätsbestimmung	20
3. Ergebnisse	21
III. Bildung von O-Peptiden und Depsipeptiden	27
1. Bildung unter den Bedingungen der Gefrier- trocknung	27
2. Isolierung und Strukturbeweis durch kinetische Messungen und Infrarotspektroskopie	30
Zweiter Teil	
<u>Untersuchung der Reaktionen in rein wässriger Lösung</u>	
IV. Hydrolyse des Glycyl-DL-serins in Wasser	38
1. Substanzen	
a. ^{14}C -Glycyl-DL-serin	39
b. Wasser	40
2. Kinetische Messungen	40
3. Ergebnisse	41

V.	Umlagerung des O-Glycyl-DL-serins	44
1.	Synthese des O-Glycyl-DL-serins	44
2.	Messung der Umlagerungsgeschwindigkeit mit Hilfe einer potentiometrischen Methode	47
3.	Ergebnisse	52

Dritter Teil

Diskussion der Versuchsergebnisse

VI.	Theorie des Übergangszustandes als Grundlage der Diskussion	59
1.	Theoretische Deutung der experimentellen Größen	60
2.	Kompensationseffekt	65
VII.	Hydrolyse der Peptidbindung	72
1.	Hydrolyse in saurer Lösung	72
2.	Hydrolyse in neutraler Lösung	82
VIII.	Umlagerung des Serinpeptids: Die Wanderung des Glycylrestes	88
1.	vom Sauerstoff zum Stickstoff	88
2.	vom Stickstoff zum Sauerstoff	97
IX.	Schlußbetrachtung	100
	Zusammenfassung	101
	Anhang	102

A n h a n g :

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	103
I. Aktivitätsmeßwerte	104
II. Meßwerte zur Umlagerungsgeschwindigkeit des O-Glycyl-serins	113

Literaturverzeichnis

- 1) M.L. Bender, Chem.Revs., 60, 53 (1960)
- 2) L. Josefsson und P. Edman,
Biochim.et Biophys. Acta, 25, 614 (1957)
L. Josefsson, Arkiv Kemi 12, 183 (1958)
12, 195 (1958)
- 3) K. Narita, J. Am. Chem. Soc., 81, 1751 (1959)
- 4) L.B. Smillie und H. Neurath,
J. Biol. Chem., 234, 355 (1959)
- 5) A.H. Gordon, A.J.P. Martin und R.L.M. Synge,
Biochem. J., 35, 1369 (1941)
- 6) P. Desnuelle und A. Casal,
Biochim. et Biophys. Acta, 2, 64 (1948)
- 7) M. Bergmann und A. Miekeley,
Hoppe - Seyl. Z. physiol. Chemie, 140, 128 (1924)
- 8) D.F. Elliot, Biochem. J., 50, 542 (1952)
- 9) J. Heidberg, Diplomarbeit, Frankfurt a. Main 1959
- 10) H. Jung, Dissertation, Frankfurt am Main 1958
- 11) Th. Wieland und G. Pfeleiderer,
Angew. Chem., 67, 257 (1955)
- 12) J. Heintges, Dissertation, Frankfurt am Main 1959
- 13) Th. Wieland und H. Bernhard,
Liebigs Ann. Chem., 572, 190 (1951)
- 14) M. Bergmann und L. Zervas,
Ber., 65, 1192 (1932)
- 15) H.K. Miller und H. Waelisch ,
J. Am. Chem. Soc., 74, 1092 (1952)
- 16) K. Schmeiser, Radioaktive Isotope, Springer-Verlag,
Berlin - Göttingen - Heidelberg 1957
- 17) M. Volmer, Kinetik der Phasenbildung,
Verlag Th. Steinkopff, Dresden und Leipzig 1939
- 18) W. Brügel, Einführung in die Ultrarotspektroskopie,
Dr. Dietrich Steinkopff-Verlag, Darmstadt 1954
- 19) H.A. Staab, Einführung in die theoretische organische
Chemie, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1959, S.591
- 20) F. A. Long und M. Purchase,
J. Am. Chem. Soc., 72, 3267 (1950)

- 21) A.R. Olson und R.J. Miller,
J. Am. Chem. Soc., 60, 2687 (1938)
- 22) H. Zahn und E. Schnabel,
Liebigs Ann. Chem., 605, 212 (1957)
- 23) J.A. Moore, J.R. Dice, E.D. Nicolaides,
R.D. Westland und E.L. Wittle,
J. Am. Chem. Soc., 76, 2884 (1954)
- 24) R.G. Bates, Electrometric pH Determinations,
John Wiley & Sons, New York 1954
- 25) K. Schwabe, Fortschritte der pH Meßtechnik,
VEB Verlag Technik Berlin 1958
- 26) E.A. Guggenheim, Phil. Mag., 2, 538 (1926)
- 27) S. Glasstone, K.J. Laidler und H. Eyring,
The Theory of Rate Processes, McGraw-Hill
Book Company, Inc. New York and London 1941
- 28) R. Fowler and E.A. Guggenheim,
Statistical Thermodynamics, Cambridge at the
University Press 1952
- 29) G. Kortüm, Lehrbuch der Elektrochemie,
Verlag Chemie Weinheim/Bergstr. 1957
- 30) A.A. Frost and R.G. Pearson, Kinetics and Mechanism,
Verlag John Wiley & Sons, Inc. New York . London 1961
- 31) P. Rüetschi, Z. physik. Chem., N.F. 14, 277 (1958)
- 32) G. Herzberg, Molecular Spectra and Molecular
Structure, I. Spectra of Diatomic Molecules
D. van Nostrand Company, Inc.
Princeton . New York . London . Toronto 1957, S.101
- L. Pauling and E.B. Wilson,
Introduction to Quantum Mechanics, McGraw-Hill Book
Company, Inc. New York and London 1935
- 33) E.A. Moelwyn-Hughes, The Kinetics of Reactions in
Solution, Oxford at the Clarendon Press, 1947
- 34) F. Becker, Z. Naturforschg. 16b, 236 (1961)
- 35) J. Fernandez, Mitteilung
- 36) A. Weller, Z. physik. Chem., N.F. 17, 224 (1958).
M. Eigen, The Study of Fast Reactions,
Disc. Faraday Soc., 17, 194 (1954). S. Lit. Zit.(30)

- 37) H.S. Harned and B.B. Owen,
The Physical Chemistry of Electrolytic Solutions,
Reinhold Publ. Corp. New York 1958, S.716
Die angegebenen molalen Aktivitätskoeffizienten
wurden in die molaren umgerechnet.
- 38) J.T. Edsall und J. Wyman,
Biophysical Chemistry, Academic Press Inc. Publishers,
New York 1958 Vol. I., S.458
- 39) D.H. Everett and B.R.W. Pinsent,
Proc. Roy. Soc. A, 215, 416 (1952)
- 40) E.J. Cohn and J.T. Edsall,
Proteins, Amino Acids and Peptides as Ions and
Dipolar Ions, Reinhold Publ. Corp. New York 1943
- 41) C.N. Hinshelwood, K.J. Laidler and E.W. Timm,
J. Chem. Soc., 848 (1938)

I. Problemstellung und Aufbau der Arbeit.

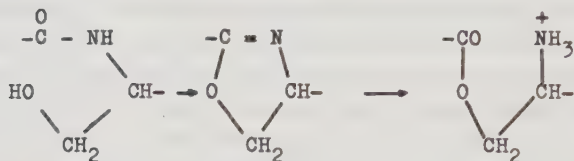
Bei einer Anzahl proteolytischer Enzyme mit Proteinstruktur, dem Chymotrypsin, Trypsin, Pepsin und anderen, lassen sich prosthetische, nichteweißartige Gruppen nicht nachweisen. Die katalytische Wirkung dieser Enzyme wird daher durch die Reaktivität und die räumliche Anordnung der das Protein aufbauenden Aminosäuren bestimmt. Es stellte sich heraus, daß im Laufe der enzymatischen Transacylierung kovalente Substrat-Enzymbindungen geknüpft und gelöst werden. Die Hydroxygruppe des Serins wirkt hierbei als nucleophiles Agens im aktiven Zentrum jener Enzyme. Die Spaltung und Bildung der kovalenten Bindungen vollzieht sich zwischen Atomen des durch Wasserstoffbrücken oder ähnliche Bindungen zusammengehaltenen Substrat-Enzym-Komplexes im Zuge einer intramolekularen Umlagerung.¹⁾

Während sich in der Literatur über die hydrolyse-beschleunigende Wirkung des Imidazols, das als Bestandteil des Histidins am Aufbau der aktiven Zentren jener Enzyme ebenfalls beteiligt ist, zahlreiche Angaben befinden¹⁾, sind über die Reaktivität des Serins als Baustein eines Peptids nur wenige Arbeiten, und diese mit zum Teil unsicheren Resultaten, bekannt.

Nach Josefsson und Edman (1957)²⁾ soll die Behandlung von Ribonuclease und Lysozym mit wasserfreier Ameisensäure die Wanderung des Peptidylrestes vom Stickstoff zum Sauerstoff einer OH-haltigen Aminosäure und damit eine Inaktivierung dieser Enzyme hervorrufen. Durch Umkehrung des Prozesses in schwach alkalischer wässriger Lösung wird die enzymatische Aktivität wieder hergestellt.

Dem stehen die Versuchsergebnisse von Narita (1959)³⁾ sowie von Smillie und Neurath (1959)⁴⁾ gegenüber, wonach wasserfreie Ameisensäure N-Acetylserin bzw. Trypsin formyliert und keine wesentliche Acylverschiebung verursacht.

Die von Gordon, Martin und Syngé (1941)⁵⁾ beobachtete rasche Spaltung von Peptidbindungen in konzentrierter Salzsäure, an welchen Serin mit seiner Aminogruppe teilhat, deuten Desnuelle und Casal (1948)⁶⁾ durch die Annahme, daß die Hydrolyse jener Peptide über ein Δ^2 -Oxazolin verläuft, welches sich in einen leicht hydrolysierbaren Ester umwandelt.



Diese Hypothese stützt sich auf Arbeiten M. Bergmanns und seiner Mitarbeiter (1924)⁷⁾, welche die Umwandlung von Modellpeptiden, wie N-Benzoylserin in substituierte Oxazoline mit Hilfe von Thionylchlorid sowie die weitere Spaltung des Oxazolins mit verdünnter Säure über den Ester zu Benzoesäure und Serin beschrieben.

Elliot (1952)⁸⁾ wies bei der Suche nach einer spezifischen Methode zur Spaltung bestimmter Peptidbindungen in einem Protein die Wanderung des Peptidylrestes vom Stickstoff zum Sauerstoff in konzentrierter Schwefelsäure nach. In einer früheren Arbeit isolierten wir das unter diesen Bedingungen aus Alanylserin entstandene Δ^2 -Oxazolin⁹⁾.

Aus dieser Literaturübersicht geht hervor, daß die Hydroxygruppe des Serins bisher nur unter extremen Versuchsbedingungen zur Reaktion gebracht werden konnte.

Es ist daher zu prüfen, ob die nucleophile Reaktivität der Hydroxygruppe des in eine Peptidkette eingebauten Serins gegenüber dem Carbonylkohlenstoffatom einer Peptidbindung auch unter milden Versuchsbedingungen in Erscheinung tritt. Da intermolekulare Transacylierungen durch Serin in wässriger Lösung nicht katalysiert werden, dürfte eine Aussage im Hinblick auf die Reaktivität des Serins nur möglich sein, wenn relevante intramolekulare Umsetzungen studiert

werden. Wahrscheinlich stellt die Hydrolyse von Serinpeptiden des Typus X-Ser die Folge zweier Reaktionsschritte, einer intramolekularen Umlagerung zum O-Peptid und dessen anschließende Hydrolyse, dar.⁹⁾ Kinetische Versuche über die Spaltbarkeit von Peptidbindungen unter dem Einfluß benachbarter Substituenten wurden von Hartmann und Jung¹⁰⁾ angestellt.

Aus diesem Sachverhalt heraus bestand die erste Aufgabe der vorliegenden Arbeit in der Bestimmung der kinetischen Daten der Hydrolyse eines geeigneten Serinpeptids unter den gleichen Versuchsbedingungen, die Hartmann und Jung bei ihren Studien über die Spaltung von aus bifunktionellen Aminosäuren aufgebauten Peptiden anwandten. Nach Einstufung der gemessenen kinetischen Daten der Hydrolyse in das durch Variation der als Bindungspartner fungierenden Aminosäuren erhaltene Reaktivitätssystem wurde, die Versuchsbedingungen variierend, die Hydrolyse in rein wässriger Lösung untersucht. Diese verläuft außerordentlich schnell. Um eine Grundlage für die Deutung dieses Befundes zu gewinnen, wurde schließlich das Verhalten des möglicherweise bei der Hydrolyse als Zwischenkörper entstehenden O-Peptids im isoelektrischen Bereich des Peptids studiert.

In einer früheren Arbeit hatte sich die Zonen-Hochspannungselektrophorese nach Th. Wieland und G. Pfeleiderer¹¹⁾ für die praktisch verlustfreie Trennung von Peptiden und analogen Verbindungen als brauchbar erwiesen.⁹⁾ Bei der notwendig ohne Änderung des Hydrolysegrades auszuführenden Analyse der Peptidhydrolysate bedienten wir uns daher zur Trennung der Peptide und Peptidbausteine neben der Papierchromatographie der Elektrophorese. Wie von Hartmann, Jung und Heintges^{10, 12)} wurde auch in dieser Arbeit die quantitative Bestimmung der getrennten Hydrolyseprodukte durchgeführt, indem die Radioaktivität der vor ihrer Hydrolyse geeignet mit ¹⁴C markierten Peptide bzw. Aminosäuren gemessen wurde. Beim Studium der Umlagerungsreaktion des O-Glycylserins wandten wir eine potentiometrische Methode an.

Erster Teil.

Untersuchung der Reaktionen in saurer Lösung.

Hartmann und Jung hydrolisierten eine Reihe von aus bifunktionellen Aminosäuren bestehenden Peptiden in 0,5 n Salzsäure bei verschiedenen Temperaturen. Um die zu erwartenden Meßergebnisse mit diesen bekannten Größen vergleichen zu können, führten wir die Spaltung des Serinpeptids ebenfalls in 0,5 n Salzsäure bei vier verschiedenen Temperaturen aus.

Wegen der sauberen chromatographischen und elektrophoretischen Trennbarkeit seiner Hydrolysate verwandten wir das Alanylserin als Substrat bei unseren Versuchen. Die unter den Bedingungen der Gefriertrocknung der schwach salzsauren Lösung des Alanylserins vor sich gehenden Prozesse mußten aufgeklärt werden, da die Auswertung der bei den kinetischen Versuchen erhaltenen Meßergebnisse erst möglich war, als jene Vorgänge übersehen werden konnten.

II. Hydrolyse des DL-Alanyl-DL-serins in saurer Lösung.

1. Synthese des ^{14}C -DL-Alanyl-DL-serins.

Die Indizierung des Peptids richtet sich nach der Trennbarkeit seiner Hydrolyseprodukte, die durch Versuche mit inaktivem Material ermittelt wurde.

Bei der chromatographischen Trennung auf dem Papier 2043b (ausgewaschen) von Schleicher und Schüll in dem Lösungsmittel sec. Butanol-Ameisensäure-Wasser (750 : 133 : 117 Vol.-Teile) und bei der Elektrophorese in dem Puffergemisch Eisessig-Pyridin-Wasser (100 : 7 : 893 Vol.-Teile) auf dem Papier MN 2214 von Macherey und Nagel ergaben sich die folgenden R_F -Werte und relativen apparenten Beweglichkeiten v

	R_F	v
Alanin	1,0	1,0
Serin	0,5	0,8
Alanylserin	0,5	1,4; 1,6 x)
Dehydroxyalanylserin	0,65	1,65
Depsipeptid	0,05	2,4
O-Alanylserin	0,05	3,2

x) Das diastereoisomere DL-Alanyl-DL-serin spaltet bei der Elektrophorese in seine beiden Stereoisomerenpaare auf.

Da wir die Hydrolysate chromatographisch und elektrophoretisch zu trennen beabsichtigten, wurde den R_F -Werten entsprechend das Alanin im Alanylserin mit ^{14}C markiert.

Die spezifische Aktivität des Peptids stellten wir mit etwa 1,5 m C/Mol so ein, daß mit dem zur Verfügung stehenden Meßgerät die geringste zur Auszählung kommende Peptid- bzw. Aminosäuremenge noch bequem, d.h. mit etwa 100 Imp/min gemessen werden konnte. Diese geringste zur Auszählung gelangende Menge ergab sich, wie noch näher ausgeführt werden wird, aus der Kapazität der Trennmedien und der Forderung, daß die Strahlungsselbstabsorption der weichen β -Strahlung des ^{14}C in der schwersten zu messenden Probe nicht ins Gewicht fiel, d.h. daß die Flächendichte des Präparats den Wert von etwa 0,15 mg/cm² mit einem noch zu akzeptierenden Aktivitätsverlust von 2% nicht überschreitet.

Das an der Carboxylgruppe markierte Alanin wurde vom Radiochemical Centre, Amersham, Buckinghamshire, England, bezogen.

Die Synthese des Alanylserins wurde nach dem Wielandschen Anhydrid-verfahren¹³⁾ ausgeführt.

Centimolare Mengen des nach der Methode von M. Bergmann¹⁴⁾ dargestellten ^{14}C -Carbobenzoxylanins und des nach Waelch¹⁵⁾ gewonnenen Serinbenzylesters kuppelten wir in

20 ml abs. Tetrahydrofuran mit Hilfe von Chlorkohlensäure-äthylester zum ^{14}C - Carbobenzoxy-alanyl-serin-benzylester. Nicht umgesetzte Ausgangskörper wurden aus der Essigesterlösung mit 1n Salzsäure bzw. 5%iger Natriumbikarbonatlösung extrahiert. Der beim Abdestillieren des Essigesters im Vak. erhaltene ölige Rückstand wurde aus Chloroform/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 70% d.Th. Fp. 116-118°C

Analyse: M = 400,5; $\text{C}_{21} \text{H}_{24} \text{N}_2 \text{O}_6$

Berechnet: C 63,0% H 6,04% N 6,99%

Gefunden: 63,0% 5,93% 6,95%

Das reine Peptid wurde dargestellt, indem in 1%iger Lösung der Carbobenzoxy- und Benzylrest gleichzeitig in mit einem Vol-% Eisessig versetzten Methanol p.A. durch katalytische (Pd-Mohr) Hydrogenolyse entfernt und das erhaltene Produkt aus Wasser/abs.Äthanol umkristallisiert wurde.

Ausbeute: 70% d.Th. Fp. 211°C

Analyse: M = 176,2; $\text{C}_6 \text{H}_{12} \text{N}_2 \text{O}_4$

Berechnet: C 40,9% H 6,87% N 15,90%

Gefunden: 40,8% 6,95% 15,53%

Das Peptid war chromatographisch und elektro-phoretisch einheitlich.⁹⁾

II. 2. Kinetische Messungen.

Im Hinblick auf das gewünschte Vergleichen der Meßergebnisse spalteten wir das Alanylserin zunächst in 0,5n Salzsäure bei verschiedenen Temperaturen unter denselben Bedingungen, die Hartmann und Jung bei der Hydrolyse einer Reihe anderer Peptide anwandten.¹⁰⁾ Der Einfluß der Hydroniumionen auf die Hydrolysegeschwindigkeit des Alanylserins wurde eruiert, indem die Hydrolyse bei konstanter Temperatur in 0,500 n, 0,600 n, 1,00 n und 2,00 n Salzsäure (Merck) und in 1,00 n

Salzsäure bei drei verschiedenen Temperaturen ausgeführt wurde. Da wir in einer früheren Arbeit die leichte Dehydratisierbarkeit des Alanylserins in saurer Lösung bei erhöhter Temperatur nachgewiesen hatten⁹⁾, stellten wir alle kinetischen Versuche in saurer Lösung unterhalb 50°C an. Die Halbwertszeiten der Hydrolyse liegen unter diesen Bedingungen bei bis zu 320 Tagen. Die Temperaturkonstanz der Thermostaten beträgt in dem genannten Temperaturbereich bei monatelangem Betrieb ohne besondere weitere Maßnahmen bei sorgfältiger Wartung von Heizung und Kühlung durch Leitungswasser $\pm 0,1^\circ\text{C}$.

II. 2.a. Durchführung der Hydrolyse.

Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurde durch Einwaage und Lösen in der entsprechenden Menge Säure eine etwa 0,005 molare Lösung des Peptids hergestellt. Jeweils 2,2 ml der Lösung füllten wir in Reagenzgläschen aus Fiolaxglas und schmolzen diese ab. Zur Ermittlung einer Geschwindigkeitskonstanten wurden gleichzeitig 10 - 12 solcher Gläschen, in mit Wasser gefüllten und mit Blei beschwerten Flaschen aufbewahrt, in einen geeignet temperierten Ultrathermostaten (Haake oder Lauda) gebracht. In sich aus vorhergehenden Versuchen ergebenden Zeitabständen entnahmen wir ein Gläschen, kühlten es in Eiswasser und pipettierten je 1 ml der Lösung in kleine Abdampfschalen. In diesen wurde die Lösung sofort in flüssiger Luft eingefroren und das Lösungsmittel in einem großen Exsikkator über Silikagel und Ätznatron bei etwa 0,1 Torr durch eine mit flüssiger Luft gefüllte Kühlfalle abgepumpt, währenddessen der weitaus größte Teil der Lösung gefroren blieb. Auf die chemischen Umsetzungen, die das Alanylserin während dieses Prozesses erleidet, kommen wir noch ausführlich zurück.

Der zunächst unsichtbare, hygroskopische Rückstand (je 1 mg) wurde chromatographisch oder elektrophoretisch getrennt.

II. 2b. Zonenelektrophoretische und papierchromatographische Trennung der Hydrolysate.

Die Trennwirkungen der Zonenelektrophorese und der Papierchromatographie sind verschieden und ergänzen sich gegenseitig. Während die Trennung des O-Alanylserins und des Depsipeptids elektrophoretisch sehr klar ist und chromatographisch gar nicht gelingt, ist der Nachweis des Dehydroxy-Alanylserins chromatographisch sicherer. Da die elektrophoretische Trennung im allgemeinen schärfer als die chromatographische ist, wurde nur der kleinere Teil der Hydrolysate zur Kontrolle, ob die Dehydratisierung des Peptids neben der Hydrolyse eine Rolle spielt, chromatographisch getrennt.

Zur chromatographischen Trennung nahmen wir das Hydrolysat in 0,1 ml Wasser auf und trugen die Lösung mittels einer gut gerundeten Pipette längs einer 27 cm langen Bleistiftmarkierung auf dem 58 x 58 cm² großen Papierbogen SS 2043 b (ausgewaschen) auf. Es wurde viermal mit Wasser nachgespült; vor jeder Spülung wurde das Papier mit dem Föhn getrocknet. Da in dem angewandten Lösungsmittel sec. Butanol-Ameisensäure-Wasser (im Vol.-Verhältnis 750 : 133 : 117) die Wanderungsgeschwindigkeiten der Peptide und Aminosäuren sehr gering waren, wurden Durchlaufchromatogramme angefertigt; die Laufzeit betrug 40 h.

Für die elektrophoretische Trennung stand der Pherograph Frankfurt nach Th. Wieland und G. Pfeleiderer zur Verfügung. Als Träger benutzten wir das Papier MN 2214 (35 x 40 cm²) von Macherey und Nagel und als Puffer ein Gemisch von 100 ml Eisessig, 7 ml Pyridin und 893 ml Wasser mit dem pH-Wert 3,2. Das Hydrolysat brachten wir in 0,05 ml Wasser gelöst in einem 25 cm langen Streifen auf den mit Pufferlösung getränkten und an die Kühlplatte des Pherographen gepreßten Papierbogen; 4 mal wurde mit 0,05 ml Wasser nachgewaschen. Bei einer Feldstärke von 50 - 60 Volt/cm, bei der sich bei 0°C die Stromstärke zu 60 - 80 mA einstellte, dauerte eine Trennung 2 1/4 h.⁹⁾

Pherogramme und Chromatogramme wurden in gleicher Weise aufgearbeitet. Die feuchten Papiere wurden in einem kräftigen Luftstrom unterhalb 40°C getrocknet. Zur Erkennung der Zonen zogen wir drei dünne Striche butanolischer 0,2%-iger Ninhydrinlösung in Laufrichtung über das trockene Papier und erhitzen die Papiere 10 min auf 105°C . Die Zonen waren dann an ihrer teilweisen Färbung und an ihrer Fluoreszenz unter der UV-Lampe zu erkennen.

Die Trennung und Erkennung der Zonen war am sichersten, wenn auf ein Pherogramm bzw. Chromatogramm das Hydrolysat von 10^{-6} bis 10^{-5} Mol Alanylserin gebracht wurde. Wandte man eine geringere Menge Ausgangs-peptid an, so waren die Verluste der im Anfangsstadium der Hydrolyse in geringer Konzentration vorhandenen Aminosäuren durch Adsorption am Papier und am Glas und dgl. relativ hoch und auch durch Nachspülen mit inaktiven Aminosäuren nicht wesentlich herabzudrücken. Bei größeren Substanzmengen war die Trennung der Zonen unscharf. Bei diesen durch die Kapazität der Trennmedien vorgegebenen Substanzmengen konnte überdies unter den angewandten Meßbedingungen die Strahlungsselbstabsorption in den zur Auszählung gelangenden Proben vernachlässigt werden.

Bei Anwesenheit von mehr als 10^{-4} Mol Salz oder Säure im Hydrolysat von 10^{-6} bis 10^{-5} Mol Peptid wurden die Zonen verwaschen und überlappten sich gegenseitig. Als hydrolysierendes Agens war 0,5 n Salzsäure durch die Versuche von Hartmann und Jung vorgegeben und zweckmäßig, da bei Anwendung geringer konzentrierter Säure die Hydrolyse zu lange dauern und das Substrat außerdem seine Ladung ändern würde. Die Entfernung der Salzsäure war daher unumgänglich, wenn an dem Konzentrationsverhältnis Peptid zu Salzsäure wie 1 zu 100 als oberer Grenzwert festgehalten wurde. Wir führten die meisten kinetischen Versuche bei diesem Konzentrationsverhältnis oder darunter aus, weil hierbei die relative Änderung der Säurekonzentration von maximal 1%, welche im Laufe der Hydrolyse wegen der Bil-

dung einer basischen Aminogruppe eintrat, vernachlässigt werden konnte. Aus diesen Gründen war die Gefriertrocknung der Hydrolysatlösungen, die ein relativ schonendes Verfahren zur Eliminierung des Chlorwasserstoffs darstellt, notwendig.

II. 2c. Aktivitätsbestimmung.

Zur quantitativen Bestimmung mußten die getrennten Hydrolyseprodukte aus dem Papier eluiert werden, da wegen der geringen Härte der β -Strahlung des ^{14}C und der nicht gleichmäßigen Papierdicke eine genaue Analyse auf dem Papier nicht möglich war. Wir eluierten die ausgeschnittenen Zonen nach Art der absteigenden Chromatographie mit bidestilliertem Wasser und fingen die Eluate in Aluminiumschälchen auf, die in den Probenwechsler des Zählgerätes pasten. Die mit etwa $2\text{ }\mu\text{g}$ Netzmittel (Pril) je Schälchen versetzten Lösungen dampften wir in einem Luftstrom langsam unter der IR-Lampe ein.

Die trockenen Proben zählten wir in dem Methandurchflußzähler F H 51 mit dem 277 -Zählrohr F H 512 der Fa. Fricke und Hoepfner, Erlangen-Bruck, aus. Die Meßbedingungen, d.h. die Ansprechwahrscheinlichkeit des Detektors, der Geometriefaktor, der Absorptions- und der Streufaktor wurden bei der Aktivitätsbestimmung der Präparate eines Hydrolyсата konstant gehalten. Die Strahlungsselbstabsorption in den Meßproben konnte vernachlässigt werden. Der obere Grenzwert der Zählverluste durch Strahlungsselbstabsorption betrug bei der maximalen Flächendichte d von $0,15\text{ mg/cm}^2$ 2%, wenn in der Gleichung zur Bestimmung des Selbstabsorptionsfaktors f

$$f = \frac{1 - e^{-ad}}{ad}$$

für den Massenabsorptionskoeffizienten a von ^{14}C $0,25\text{ cm}^2/\text{mg}$ eingesetzt wurde.¹⁶⁾

Da während der langen Versuchszeiten zur Ermittlung einer Geschwindigkeitskonstanten die gleichen Meßbedingungen nicht exakt aufrecht erhalten werden konnten, wurde die Gesamtaktivität eines jeden Hydrolysats gemessen. Man gewann auf diese Weise außerdem eine Kontrolle über den Ablauf der Reaktion und wurde von eventuellen Aktivitätsverlusten während der Aufarbeitung der Hydrolysate unabhängig, wenn das Hydrolysat als Ganzes betroffen wurde.

Die Aktivitätsverluste bei der Trennung und Bestimmung der Peptidbausteine nach dem geschilderten Verfahren betrugen etwa 5%. Diese Aktivitätsabnahme beruht nicht nur auf dem Verlust an radioaktiven Peptiden bzw. Aminosäuren durch Adsorption am Papier und am Glas und dgl., sondern auch auf dem scheinbaren Aktivitätsverlust der Präparate, der infolge ihrer Verdünnung durch nicht zu eliminierende Verunreinigungen im Papier und Puffer verursacht wird. Die Genauigkeit der quantitativen Bestimmung der radioaktiven Hydrolyseprodukte betrug im Mittel 4%.

II. 3. Ergebnisse.

Infolge der Komplikationen bei der Gefriertrocknung salzsaurer Serinpeptidlösungen war die Auswertung der Versuchsergebnisse erst möglich, als die hierbei ablaufenden Vorgänge hinreichend aufgeklärt waren. Wir teilen daher an dieser Stelle schon mit, daß ein Teil des Alanylserins unter den Bedingungen der Gefriertrocknung in Depsipeptide und O-Alanylserin umgewandelt wird. Die Aktivität des Alanylserins zur Zeit t der Hydrolyse war daher gleich der Summe aus den Aktivitäten des Depsipeptids und O-Peptids und der Aktivität des restlichen Alanylserins.

Die Aktivitäten waren den Mengen und diese im Hinblick darauf, daß immer die gleichen Volumina der Lösung analysiert wurden, den Konzentrationen der Reaktionsteilnehmer proportional; die geringe Temperaturabhängigkeit der Konzentration (bei konstanter Masse der Lösung) spielte in

diesem Zusammenhang keine Rolle. Konzentration bedeutet Menge Substanz pro Volumeneinheit (Mol/l).

Nach den bisher an Carbonsäurederivaten¹⁾ und im besonderen an Peptiden¹⁰⁾ gewonnenen Erfahrungen sollte auch die Hydrolyse des Alanylserins in saurer Lösung nach einem Zeitgesetz 1. Ordnung bezüglich des Peptids verlaufen. Tatsächlich ließen sich die Logarithmen der Konzentrationen c des Alanylserins als Funktion der Zeit t in befriedigender Weise längs einer Geraden anordnen.

$$\ln \frac{c}{c_0} = -kt \quad (1)$$

Aus den graphischen Darstellungen ließen sich die Halbwertszeiten T ablesen und die zugehörigen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k nach

$$k = \frac{1}{T} \ln 2 \quad (2)$$

berechnen. Wir benutzten dieses graphische Verfahren zur Mittelwertbildung der k -Werte, da die rechnerischen Methoden bei ungleich größerem Aufwand in dem gegebenen Fehlerbereich von 3% nur unwesentlich genauere Ergebnisse geliefert hätten.

Die Logarithmen der bei 4 bzw. 3 verschiedenen Temperaturen ermittelten k -Werte wurden nach Arrhenius gegen die reziproke absolute Temperatur aufgetragen und aus der Steigung der erhaltenen Geraden die Arrheniussche Aktivierungsenergie E_A bestimmt. Die Arrheniussche Aktionskonstante A ergab sich dann zu

$$\log A = \frac{E_A}{RT \cdot 2,30} + \log k_T \quad (3)$$

Der Fehler der Arrheniusschen Aktivierungsenergie ließ sich nach der Gleichung

$$\partial \Delta \ln k = \Delta \left(\frac{1}{T} \right) \cdot \partial E_A \quad (4)$$

oder

$$2 \frac{\partial k}{k} = \Delta \left(\frac{1}{TR} \right) \partial E_A \quad (4a)$$

zu

$$\partial E_A = 0,6 \text{ Kcal/Mol}$$

abschätzen, wenn die Temperaturunbestimmtheit vernachlässigt und für den mittleren relativen Fehler der Geschwindigkeitskonstanten 2% gesetzt wurde. Analog ergab sich für den relativen Fehler der Aktionskonstanten

$$\frac{\partial A}{A} = \frac{\partial k}{k} + \frac{\partial E_A}{RT} \quad (5)$$

$$\frac{\partial A}{A} \approx 1$$

Eine Ausgleichsrechnung unter Zugrundelegung der Arrhenius-schen Gleichung liefert beim Einsetzen der gefundenen k-Werte ohne Berücksichtigung ihrer Unbestimmtheit in diesem Fall zu kleine Fehler.

Halbwertszeiten τ und Geschwindigkeitskonstante k

$[H^+]$ Mol/l	$t^\circ C$	τ d	$k \cdot 10^3$ d^{-1}	$k/[H^+] \cdot 10^3$ $d^{-1} \text{ l.Mol}^{-1}$
0,500	32,0	324	2,14	4,28
0,600	32,0	266	2,61	4,36
1,00	32,0	140	4,96	4,96
2,00	32,0	52	13,3	6,65
0,500	36,9	178	3,9	7,8
1,00	36,9	75	9,2	9,2
0,500	41,6	100	6,9	13,8
1,00	41,6	44	15,8	15,8
0,500	44,9	72	9,6	19,2

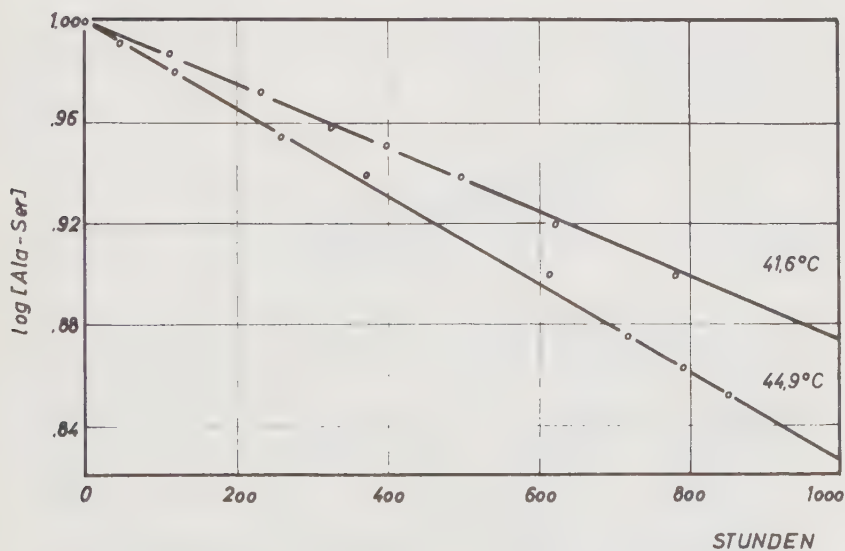
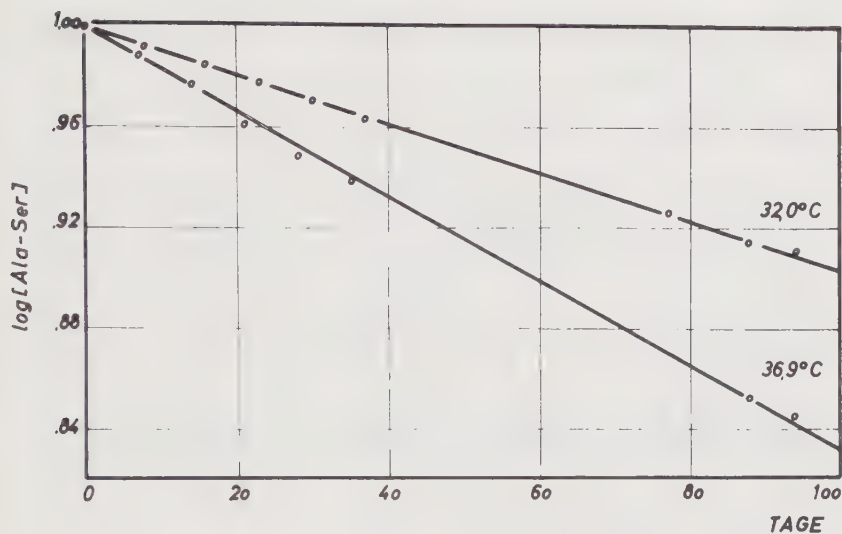
Aktivierungsenergien E_A und Aktionskonstante A

$[H^+]$	E_A	$\log A$
Mol/l	Kcal/Mol	(d^{-1})
0,500	$23,3 \pm 0,6$	$14,0 \pm 0,3$
1,00	$23,0 (\pm 0,6)$	$14,2 (\pm 0,3)^*$

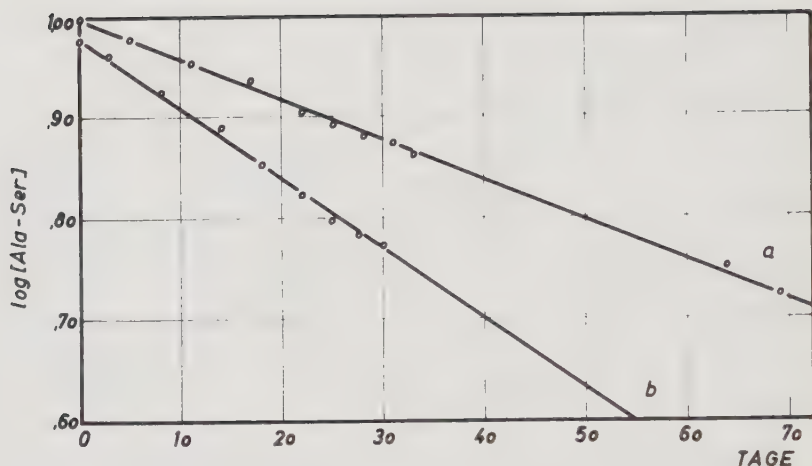
* Der Berechnung von $\log A$ wurden die nicht-normierten k -Werte zugrunde gelegt.

Auf den nächsten Seiten findet man als typische Beispiele einige graphische Darstellungen des zeitlichen Verlaufs der Hydrolyse des Alanylserins sowie die Arrheniusschen Geraden.

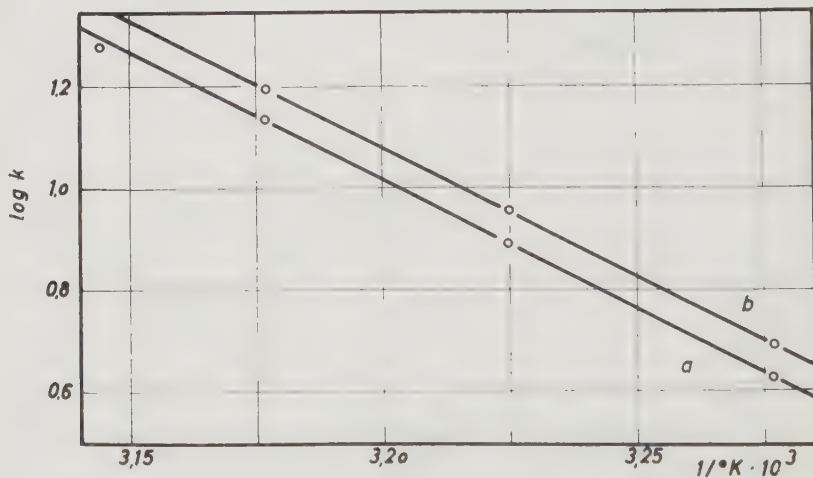
Die Aktivitätsmesswerte sind im Anhang tabelliert.



HYDROLYSE DES DL-ALANYL-DL-SERINS IN 0,5n SALZSÄURE
BEI 32,0°C, 36,9°C (a) BZW (b), 41,6°C, 44,9°C



HYDROLYSE DES DL-ALANYL-DL-SERINS IN 1n SALZSÄURE BEI
36,9 °C (a) UND 41,6 °C (b)



ARRHENIUSGERADEN DER HYDROLYSE DES DL-ALANYL-DL-SERINS IN 0,5n (a) UND 1n (b) SALZSÄURE (NACH NORMIERUNG DER k -WERTE AUF 1n HCL)

III. Bildung von Depsiptiden und O-Peptiden.

III. 1. Bildung unter den Bedingungen der Gefrier-trocknung.

Wir froren in drei Abdampfschalen je 1 ml einer 10°C warmen 0,008 molaren Lösung des Alanylserins in 2 n Salzsäure unmittelbar nach dem Ansetzen der Lösung in flüssiger Luft ein und zogen anschließend Wasser und Chlorwasserstoff bei 0,1 Torr über 1 kg Silikagel und 100 g Ätznatron ab. Nach 2 1/2 h war das Flüchtige entfernt. Die unsichtbaren Rückstände wurden in je 0,1 ml Wasser aufgenommen und die Lösungen auf zwei Pherogramme bzw. ein Chromatogramm gebracht. Trennung, Elution und Aktivitätsbestimmung ergaben das folgende Resultat:

	Imp/min (Elek.)	Imp/min (Elek.)	Imp/min (Chrom.)
Alanylserin	11800	11860	13000
O-Alanylserin	100	100	} 900
Depsiptid	470	700	
Alanin	0	20	0

Ähnliche Ergebnisse wurden gewonnen, wenn man 0,005 bis 0,06 molare Alanylserinlösungen in 0,5 bis 2 n Salzsäure der geschilderten Behandlung unterwarf.

In einem 2. Versuch ließen wir eine 0,06 m Alanylserinlösung in 0,6 n Salzsäure 70 h bei Zimmertemperatur stehen, entnahmen 0,05 ml der Lösung und trugen diese ohne vorherige Gefriertrocknung auf ein Pherogramm auf, das wie üblich weiter verarbeitet wurde. Das Ergebnis steht in Spalte 1.

	(1) Imp/min	(2) Imp/min
Alanylserin	4660	10100
O-Alanylserin	0	600
Depsiptid	5	2350
Alanin	10	0

2 ml der Lösung wurden wie beschrieben gefriergetrocknet, der Rückstand im 2,4 ml Wasser aufgenommen und davon 0,2 ml zur üblichen Analyse verwandt, mit dem in der Spalte 2 zusammengefaßten Ergebnis.

In einem dritten Versuch wurde die Hydrolysegeschwindigkeit des Alanylserins in 0,03 m Lösung in 0,6 n Salzsäure gemessen, ohne die Hydrolysatlösungen vor der Trennung einer Gefriertrocknung zu unterziehen, indem jeweils 0,100 ml der sauren Lösung elektrophoresiert bzw. chromatographiert wurden. Wenn auch die Zonen bei diesem Säuregehalt verwaschen waren, gelang die Trennung mit hinreichender Genauigkeit. Die Meßergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt. Bemerkenswerterweise ist die Impulsrate des O-Alanylserins ein wenig höher als diejenige des Depsipeptids. Sie scheint deshalb über dem geringen Nullpegel bei der elektrophoretischen Trennung zu liegen.

Diese Versuche zeigten, daß sich das Depsipeptid und das O-Peptid unter den Bedingungen der Gefriertrocknung bilden und daß die Ausbeuten bei diesen Umsetzungen mit steigender Konzentration des Ausgangspeptids zunehmen.

Die Reaktionen finden wahrscheinlich nicht in der gefrorenen festen Lösung, sondern in dem beobachtbaren, die feste Phase umgebenden Flüssigkeitsfilm statt, aus dem heraus auch die Verdampfung erfolgt. Wasser und Chlorwasserstoff bilden ein eutektisches System, dessen eutektischer Punkt bei -86°C und einem HCl-Gehalt von 25 %, dem $\text{HCl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, liegt.

Hydrolyse des Alanylserins in 0,6 n Salzsäure bei 32,0°C
ohne Gefriertrocknung der Hydrolysatlösungen

Zeit Tagen	Ala-Ser ipm	Ala ipm	O-Ala-Ser ipm	Depsip. ipm	Gesamtakt. ipm
0,17	5170	20	3	5	5200 E
	4300	15		10	4325 C
2,0	5200	10	5	0	5215 E
	4110	20		12	4140 C
10,0	4700	110		12	4820 C
16,0	4690	160	25	0	4875 E
	4540	200		25	4765 C
20,0	3530	170		10	3710 C
23,8	4000	220		10	4230 C
	4140	250	15	5	4410 E
26,8	4970	300		23	5300 C
	4720	280	15	0	5015 E
10,0	2800	70		540	3410 C [±]
	2430	50	90	300	2870 E [±]
16,0	2810	150		440	3400 C [±]
	3040	170	60	320	3590 E [±]

± Die Hydrolysatlösungen dieser Proben wurden gefrier-
getrocknet.

Wenn auch über die Kinetik der Phasenbildung in Mehr-
komponentensystemen wenig bekannt ist, kann die Möglich-
keit einer Gleichgewichtseinstellung bei diesen tiefen
Temperaturen nicht ausgeschlossen werden. Unterhalb
- 86°C war im Rahmen der gestellten Aufgabe eine Gefrier-
trocknung nicht möglich, da die Verdampfungsgeschwindig-

keit des Wassers bei diesen niedrigen Temperaturen zu gering ist. Nach der Beziehung (H.Hertz) ¹⁷⁾

$$v = \frac{1}{\sqrt{2\pi} R} \cdot p \sqrt{\frac{M}{T}} \quad (6)$$

beträgt der obere Grenzwert der Verdampfungsgeschwindigkeit v bei 185°K , dem entsprechenden Dampfdruck p des Wassers von 10^{-4} Torr und dem Molekulargewicht M des Wassers von 18 nur $7 \cdot 10^{-3} \text{g/cm}^2 \text{ h}$.

III. 2. Isolierung und Strukturbeweis durch kinetische Messungen und Infrarotspektroskopie .

Die Identität des O-Alanylserins war bereits in einer früheren Arbeit durch Vergleich seiner R_F -Werte und elektrophoretischen Beweglichkeiten mit denjenigen der synthetisierten Verbindung sowie durch weitere Kriterien sichergestellt worden.

Nach den Vorstellungen von D.F. Elliot, der über das reaktive Verhalten von Serinpeptiden zahlreiche Arbeiten vorgelegt hat, verläuft die reversible N,O-Peptidylwanderung über ein Hydroxyoxazolidin. Es lag daher nahe anzunehmen, daß die später als Dipsipeptid charakterisierte Verbindung das Zwischenprodukt bei der unter den Bedingungen der Gefriertrocknung sicher nicht über ein Oxazolin sich vollziehenden Umlagerung des Alanylserins darstellt. Bildungsweise, positive Ninhydrinreaktion sowie das chromatographische und elektrophoretische Verhalten sprachen für diese Annahme.

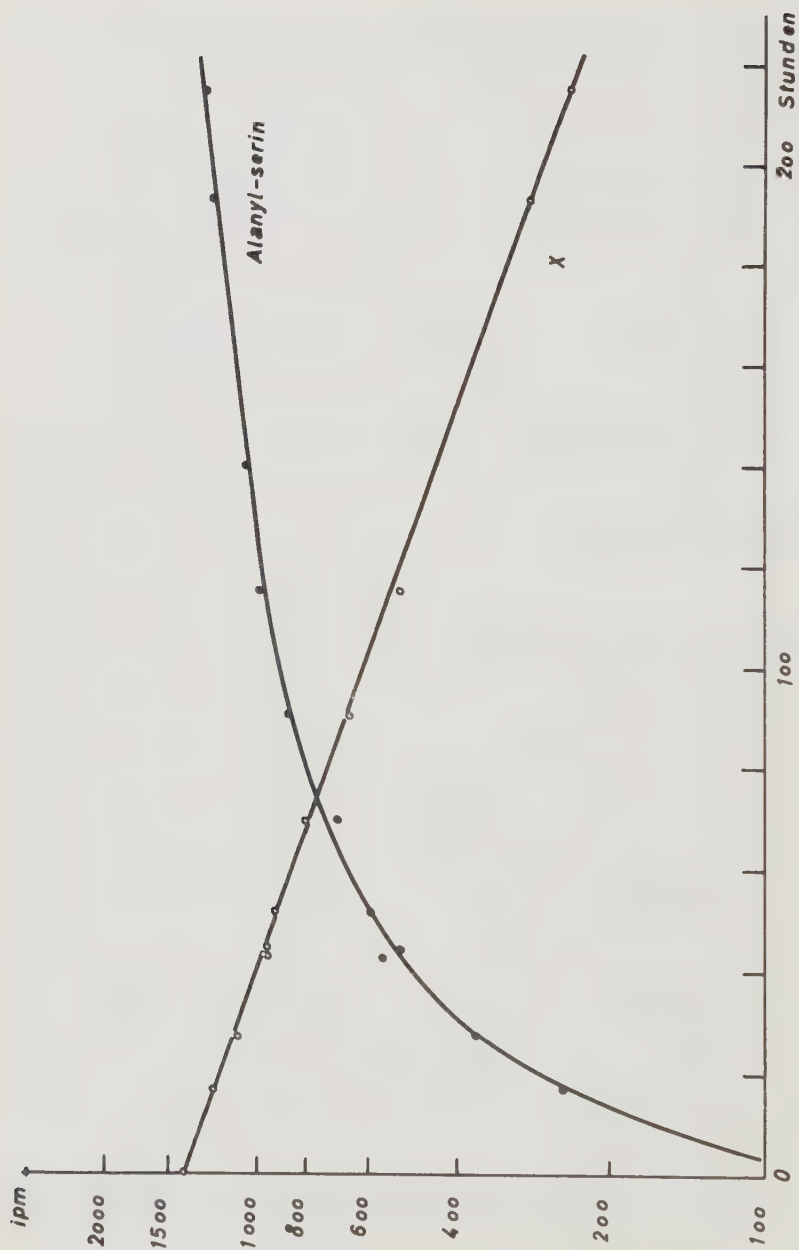
Zur weiteren Untermuerung der Struktur wurde die auf 14 Pherogrammen durch Gefriertrocknung von C-14 markiertem Alanylserin gewonnene Substanz isoliert und mit bidestilliertem Wasser eluiert, nachdem die Pherogramme zur Erkennung der Zonen teilweise mit Ninhydrin entwickelt und die entwickelten Stellen verworfen worden waren.

Bei der Gefriertrocknung des Eluats wurden 2 mg eines schmierigen Rückstandes erhalten. Nachdem die Bedingungen

für die Bildung bekannt gewesen waren, sollte untersucht werden, wie schnell und zu welchen Stoffen der Abbau jenes Körpers durch verdünnte Salzsäure verläuft. Zu diesem Zweck lösten wir den Rückstand in 1,5 ml 0,600 n Salzsäure, führten die Lösung sofort in ein durch Schliffstopfen verschließbares Mikrokölbchen über und brachten dieses in einen Thermostaten von 32,0°C. In gewissen sich aus den Ergebnissen der vorhergehenden Versuche ableitenden Zeitabständen wurde der Lösung in dem Kölbchen 0,100 ml entnommen und diese sofort elektrophoresiert bzw. in einigen Fällen chromatographiert. Die Pherogramme und Chromatogramme wurden wie beschrieben weiterbehandelt. Das Ergebnis dieses kinetischen Versuchs ist in der folgenden Tabelle und in der graphischen Darstellung niedergelegt.

Spaltung des Depsipeptids in 0,600 n HCl bei 32,0°C

Zeit	x	Ala-Ser	Ala	O-Ala-Ser	Gesamt aktiv.	x	Ala-Ser
h	ipm	ipm	ipm	ipm	ipm	%	%
0	1320	70	90	0	1480 E	89	4,7
17	1220	245	85	0	1550 E	79	15,8
27	1055	375	65	0	1495 E	71	25
43	945	565	15	-	1525 C	62	37
45	950	515	65	0	1530 E	62	34
51,3	920	580	55	0	1555 E	59	37
69,3	700	600	45	0	1345 E	52	45
90,3	650	(860)	40	0	(1550)E	42	55
115	510	980	40	0	1530 E	33	64
190	225	1080	20	0	1325 E	17	82
193	300	1210	30	-	1540 C	19,5	79
215	250	1275	30	0	1555 E	16	82



Umwandlung von X in Alanyl-serin in 0,6n HCl bei 32°C

Es ist daraus zu ersehen, daß sich die Substanz nicht wie bei Annahme einer Oxazolidinstruktur in das O-Peptid, sondern quantitativ in das N-Peptid umwandelt. Trotz des simultanen Ablaufs mehrerer Reaktionen war dieser eindeutige Befund möglich, weil der Abbau der Substanz quantitativ verfolgt wurde. Der rasche Verlauf der Spaltung machte wahrscheinlich, daß die Geschwindigkeit der Hydrolyse einer Esterbindung gemessen worden war; die weitere Hydrolyse des Alanylserins geht wesentlich langsamer vor sich.

Hydrolyse in 0,600 n Salzsäure bei 32,0°C

	T d	k d^{-1}
x	3,45	$2,01 \cdot 10^{-1}$
Alanylserin	266	$2,61 \cdot 10^{-3}$

In einem 2. Versuch wurden noch einmal 2 mg der Substanz isoliert und das Infrarotspektrum aufgenommen. Hierzu wurde die schmierige Substanz in 1 ml bidestilliertem Wasser gelöst und die Lösung, nachdem wir 5 mg KBr (z. IR-Spektroskopie, Merck) zugesetzt hatten, der Gefriertrocknung unterworfen. Die Substanz schlug sich dabei auf dem in äußerst feiner Verteilung anfallenden KBr nieder und konnte auf die übliche Weise nach Vermischen mit weiteren 800 mg KBr in einem für die Infrarotaufnahme geeigneten KBr-Preßling fixiert werden. Da aus dem Papier möglicherweise esterartige Substanzen miteluiert wurden, stellten wir auf die gleiche Weise wie eben für die Substanz X beschrieben einen KBr-Preßling vom Alanylserin her, indem wir gleichzeitig mit X das Alanylserin aus den gleichen Pherogrammen eluierten und entsprechend weiter verarbeiteten.

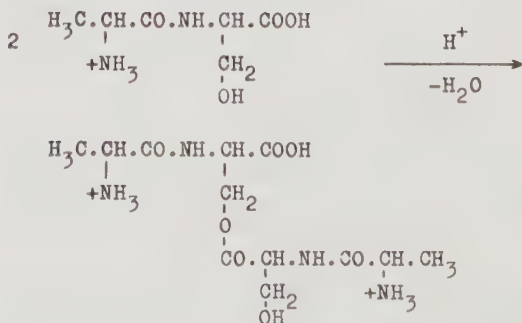
Als Modellschubstanz mit der charakteristischen, der Valenz-

schwingung der Carbonylgruppe im Ester zuzuordnenden Bande bei 1750 cm^{-1} ¹⁸⁾ diene das O-Glycylserin, das wir in besseren Ausbeuten als das O-Alanylserin darstellten. Die Spektren des O-Glycylserins wurden in Nujol und in KBr gepreßt aufgenommen, wobei im Hinblick auf die Lage der Esterbande kein Unterschied festgestellt wurde. Die Bande der Carbonyl-Valenzschwingung des Amids ist wegen des abgeschwächten Doppelbindungscharakters der C-O-Bindung nach längeren Wellenlängen verschoben: die des Alanylserins in KBr liegt bei 1700 cm^{-1} .

Das Spektrum des als Depsipeptid bezeichneten Stoffes weist nun bei 1750 cm^{-1} und bei 1700 cm^{-1} intensive Banden auf, während das Spektrum des aus dem Papier eluierten Alanylserins bei 1750 cm^{-1} keine Bande und bei 1690 cm^{-1} eine Schulter besitzt. Die Spektren des reinen Alanylserins und die des aus dem Papier eluierten sind verständlicherweise nicht völlig identisch.

Das Spektrum des in Nujol suspendierten O-Glycylserins wurde von Frl. Wetzel, Institut für organische Chemie, mit dem Perkin-Elmer Doppelstrahlspektrophotometer 21, die übrigen Spektren von Herrn Heil mit dem Unicam-Ultrarot-Spektrophotometer SP 100 aufgenommen, wofür auch an dieser Stelle freundlich gedankt sei.

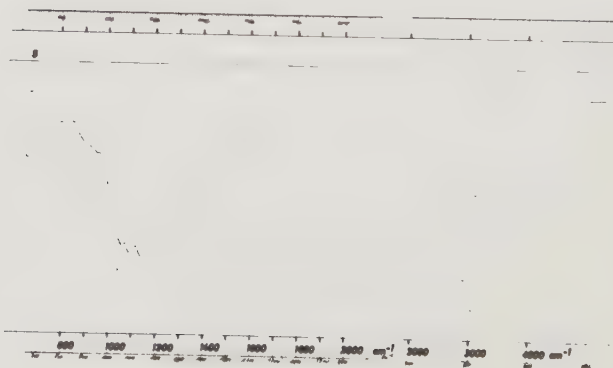
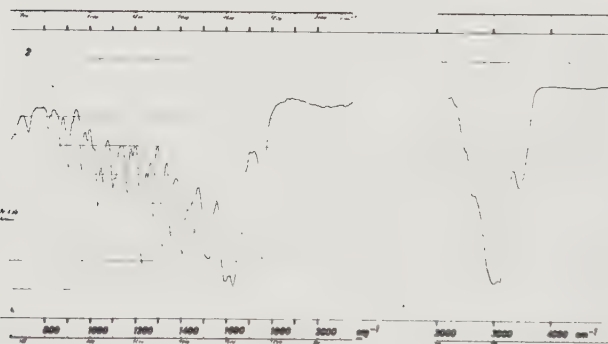
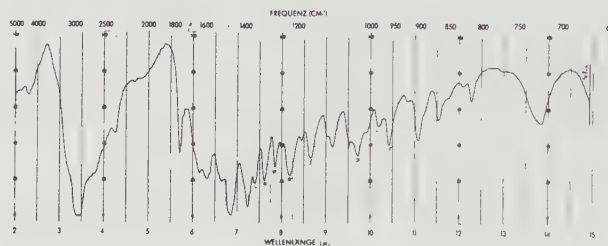
Das Depsipeptid dürfte sich nach der folgenden Gleichung bilden:



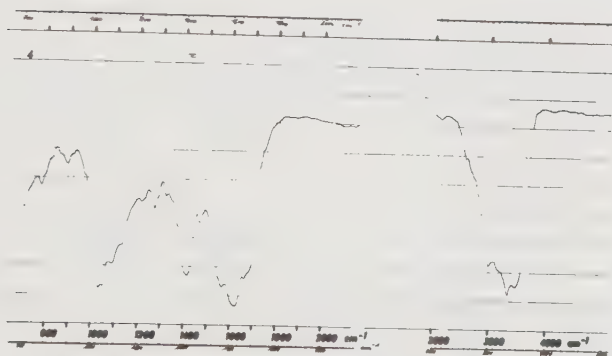
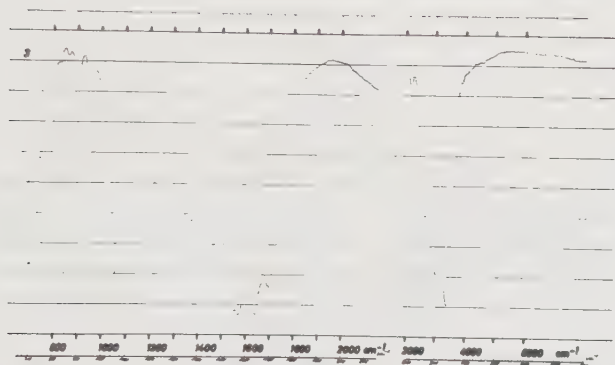
R_f -Wert, elektrophoretische Beweglichkeit, positive Ninhydrinreaktion, Infrarotspektrum, Bildungsweise und Abbaureaktionen sind mit dieser Struktur konsistent.

Bei der Gefriertrocknung konzentrierter Serinpeptidlösungen findet wahrscheinlich eine Polykondensation statt.

- (1) 6 mg O-Glyc-Ser in 0,3 ml Nujol, Schichtdicke 0,025 mm. (Perkin-Elmer). (2) 1,7 mg O-Glyc-Ser in 860 mg KBr (Unicam). (3) Depsipeptid in 5 + 800 mg KBr, elektrophor.isoliert (Unicam).



- (4) 1,8 mg Ala-Ser in 850 mg KBr (Unicam)
- (5) Ala-Ser in 5 + 800 mg KBr, elektrophoretisch isoliert (Unicam)



Zweiter Teil.

Untersuchung der Reaktionen in rein wässriger Lösung.

IV. Hydrolyse des Glycyl-Dl-serins in Wasser.

Die meisten Untersuchungen über die Hydrolyse von Carbonsäurederivaten wurden bisher in saurer oder alkalischer Lösung ausgeführt. Die Hydrolyse substituierter N-Benzoyl-imidazole in 75% Wasser- 25% Tetrahydrofuran wurde kürzlich von Staab¹⁹⁾ im Rahmen einer Studie über die Hammett-Gleichung untersucht. Long und Purchase²⁰⁾ sowie Olson und Miller²¹⁾ maßen die Aktivierungsenergien und Aktionskonstanten der alkalischen, sauren und neutralen Hydrolyse von β -Lactonen; ein Vergleich dieser Meßwerte ist jedoch nicht möglich, weil die Reaktion in alkalischer und saurer Lösung unter Acylspaltung, in neutraler dagegen unter Alkylspaltung des Lactons abläuft.

Unter vergleichbaren strukturellen Bedingungen stellen die Amide die stabilsten Carbonsäurederivate dar. Amide und somit Peptide sind daher nicht die geeigneten Substrate für vergleichende kinetische Untersuchungen in saurer und neutraler Lösung. Wenn in der vorliegenden Arbeit trotzdem Spaltversuche an Peptiden in rein wässriger Lösung gemacht wurden, so geschah dies in erster Linie im Hinblick auf die besondere Reaktivität von Serinpeptiden. Nach den Ergebnissen der kinetischen Messungen in saurer Lösung dürfte ein beträchtlicher Teil des Alanylserins über das O-Alanylserin hydrolysiert werden. Da nach unseren bisherigen Kenntnissen Acylwanderungen vom Stickstoff zum Sauerstoff in schwach saurer wässriger Lösung von pH 5 nicht stattfinden, sollten sich die kinetischen Daten der Hydrolyse des Glycylserins in schwach saurer Lösung in das durch Variation der die Peptidbindung bildenden Aminosäuren erhaltene Reaktivitätsschema einstufen lassen.

Als Substrat diente bei diesen Versuchen das Glycylserin, von dem erwartet worden war, daß es relativ schnell hydro-

lysierte. Sein Hydrolysat wurde im Gegensatz zu dem des Alanylserins chromatographisch nicht getrennt. Da die Brauchbarkeit der Elektrophorese zur quantitativen Trennung jetzt hinreichend erprobt war, konnten die Hydrolysate durch die ausschließliche Anwendung der Elektrophorese analysiert werden.

IV. 1. Substanzen.

IV. 1a. ^{14}C -Glycyl-DL-serin.

Dieses Peptid wurde kürzlich von Zahn und Schnabel²²⁾ nach dem Azidverfahren dargestellt. Nachdem sich die Wieland-sche Anhydridmethode bei der Synthese des Alanylserins bewährt hatte, schlugen wir auch bei der Gewinnung des Glycylserins diesen bequemer Weg ein.

Die Indizierung des Glycins im Glycylserin ergab sich aus der Trennbarkeit seiner Hydrolysate. Die spezifische Aktivität betrug aus den schon geschilderten Gründen 1,5 m C/Mol.

Im einzelnen wurde wie bei der Darstellung des Alanylserins vorgegangen, so daß sich eine besondere Beschreibung erübrigt.

I) ^{14}C -Carbobenzoxymethyl-DL-serinbenzylester

Ausbeute	65%	Fp	139°
Analyse:	M = 386,5	$\text{C}_{20} \text{H}_{22} \text{N}_2 \text{O}_6$	
Berechnet:	C 62,1%	H 5,73%	N 7,25%
Gefunden:	61,9%	5,62%	7,34%

II) ^{14}C -Glycyl-DL-serin

Ausbeute	70%	Fp	198°C
Analyse:	M = 162,2	$\text{C}_5 \text{H}_{10} \text{N}_2 \text{O}_4$	
Berechnet:	C 37,0%	H 6,22%	N 17,3%
Gefunden:	36,4%	6,33%	17,1%

Das Peptid war chromatographisch und elektrophoretisch einheitlich.

Zahn und Schnabel²²⁾ glauben, daß das Peptid Wasser gebunden enthält. Die Daten ihres Präparats lauten: Fp 198°,
C 35,9% H 6,45% N 16,4% .

Die Präparate wurden im mikroanalytischen Laboratorium Dr. Ing. A. Schoeller, Kronach/Oberfranken, analysiert.

IV. 1b. Wasser .

Die Hydrolyse des Glycylserins sollte in reinem Wasser ausgeführt werden, da der Einfluß der in Pufferlösungen vorhandenen schwachen Säuren und Basen von vornherein nicht zu übersehen ist und erst studiert werden kann, wenn man über den Verlauf der Spaltung in reinem Wasser orientiert ist.

Destilliertes Wasser des Handels wurde in einer Quarzapparatur zweimal destilliert und das Destillat im Sauerstoffstrom, der durch konzentrierte Schwefelsäure und Natronlauge gereinigt wurde, unter Ausschluß von Kohlensäure aufgekocht und im O₂-Strom abgekühlt. Die spezifische Leitfähigkeit des gereinigten Wassers betrug bei 20°C $8,5 \cdot 10^{-7}$ Ohm⁻¹ cm⁻¹, der pH-Wert 7,1, der jedoch wegen der bekannten Schwierigkeiten der elektrometrischen pH-Messung in ungepufferten Lösungen unsicher sein dürfte.

IV. 2. Kinetische Messungen .

Etwa 0,005 molare Lösungen des Peptids wurden in dem gereinigten Wasser bei vier verschiedenen Temperaturen hydrolysiert. Die Temperaturkonstanz der verwandten Thermostaten (Haake und Lauda) betrug 0,05°C. Die nach gewissen Zeitabständen anfallenden Hydrolysatlösungen wurden analysiert, indem sie gefriergetrocknet, der Rückstand elektrophoresiert und die isolierten Hydrolyseprodukte nach ihrer Elution durch Bestimmung ihrer Radioaktivität quantitativ erfaßt wurden.

Die Trennung nahmen wir im Eisessig-Pyridin-Wasser-Puffer (100 : 7 : 893) vor; sie dauerte je Hydrolysat etwa 2 1/2 h. Die relativen, auf die des Alanins bezogenen, apparenten

elektrophoretischen Beweglichkeiten v der Hydrolysatbestandteile sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

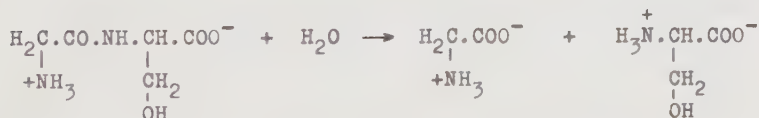
	v
Glycylserin	1,75
Glycin	1,1
Serin	0,8
O-Glycylserin	3,6

Glycylserin bildete erwartungsgemäß im Gegensatz zum Alanylserin nur eine Zone bei der Wanderung im elektrischen Feld.

Während der Gefriertrocknung der wässrigen Hydrolysatlösungen traten keine nachweisbaren Umwandlungen auf. Der Rückstand fiel - im besonderen in der Anfangsphase der Hydrolyse - in äußerst feiner Verteilung an und wurde durch schwache Gasströme aus dem Schälchen geblasen, die daher tunlichst auszuschalten waren.

IV. 3. Ergebnisse.

Der zeitliche Abfall der Konzentration c des Glycylserins läßt sich über mehrere Halbwertszeiten hinweg durch ein Zeitgesetz 1. Ordnung in bezug auf das Dipeptid darstellen. Über die kinetische Ordnung des an der Reaktion beteiligten Wassers



läßt sich wegen der geringen relativen Konzentrationsänderung keine Aussage machen.

Die Geschwindigkeitskonstanten k wurden wie beschrieben graphisch ermittelt. Ihre Unsicherheit liegt bei 2%. Die Logarithmen der vier k -Werte ordneten sich, gegen die reziproke absolute Temperatur aufgetragen, in befriedigender Weise längs einer Geraden an. Die Fehlergrenzen der auf graphischem Wege bestimmten Arrheniusschen Größen wurden mit Hilfe von Gl.(4)

bzw. (5) berechnet, wobei für den mittleren relativen Fehler der Geschwindigkeitskonstanten 1,5% eingesetzt und die Unbestimmtheit der absoluten Temperatur vernachlässigt wurde.

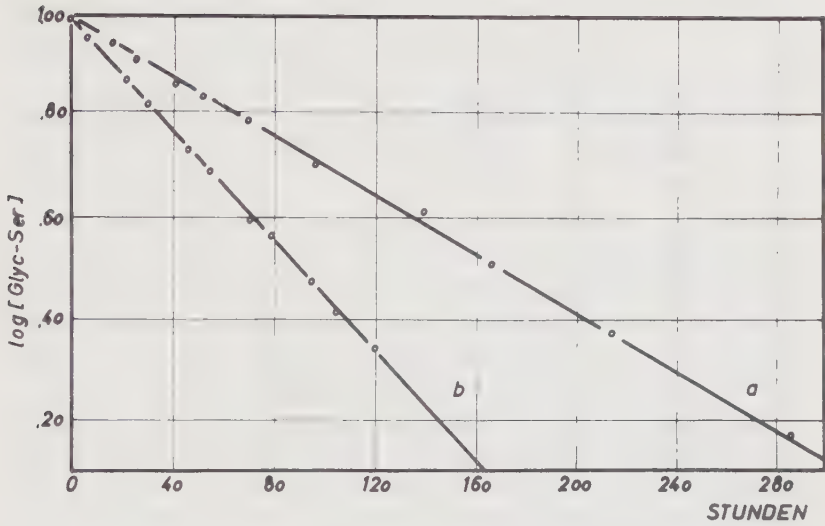
Hydrolyse des Glycylserins in reinem Wasser

$t^{\circ}\text{C}$	τ (d)	$k \cdot 10^2$ (d^{-1})
85,4	2,25	30,8
78,5	4,21	16,5
70,25	9,42	7,36
59,85	28,4	2,44

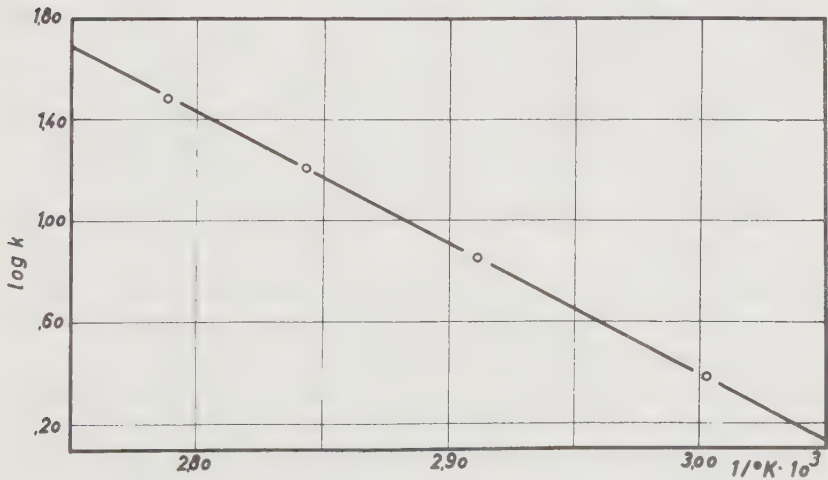
E_A Kcal/Mol	$\log A$ (d^{-1})
$23,8 \pm 0,3$	$14,0 \pm 0,2$

Die rasche Spaltung des Glycyl-serins stellt offenbar keinen Sonderfall in der Reihe der Peptide des Typus X-Ser dar. Denn die Hydrolyse des Dl-Alanyl-Dl-serins in Wasser verlief bei $76,2^{\circ}\text{C}$ noch ein wenig schneller als die des Glycylserins:

$$\tau = 3,08 \text{ d}, \quad k = 2,25 \cdot 10^{-1} \text{ d}^{-1}.$$



HYDROLYSE DES GLYCYL-DL-SERINS IN REINEM WASSER BEI
78,5°C (a) UND 85,4°C (b)



GESCHWINDIGKEITSKONSTANTE DER HYDROLYSE DES GLYCYL-DL-SERINS IN REINEM WASSER IN ARRHENIUS'SCHER DARSTELLUNG

V. Umlagerung des O-Glycyl-DL-serins.

Die überraschend schnelle Hydrolyse des Glycylserins in reinem Wasser veranlaßte uns, das Verhalten des hierbei möglicherweise als Zwischenkörper entstehenden O-Glycylserins unter den Bedingungen der Hydrolyse des N-Glycylserins zu untersuchen.

Löst man das Hydrochlorid des O-Glycylserins, das nur in dieser Form dargestellt werden konnte, in Wasser auf, so läßt sich in der Lösung, in der sich der pH 3,5 eingestellt hatte, nach tagelangem Stehen bei Zimmertemperatur keine Umsetzung erkennen. Wenn durch Zusatz von Lauge der pH-Wert der Lösung auf 5 oder darüber gebracht wurde, so wandelte sich bei gleichzeitiger pH-Erniedrigung das O-Glycylserin je nach pH innerhalb weniger Minuten bis Stunden in das N-Glycylserin um. Bei zu geringem Zusatz an Lauge kam die Reaktion vor vollständigem Verbrauch des O-Peptids zum Stehen. Der Fortgang der Reaktion wurde verfolgt, indem die Reaktionslösungen gefriergetrocknet, die Rückstände elektrophoresiert und die Pherogramme mit Ninhydrin entwickelt wurden.

Nach diesen orientierenden qualitativen Versuchen war die intermediäre Bildung des O-Peptids bei der Hydrolyse des N-Peptids nicht recht wahrscheinlich. Gleichwohl wurde die Kinetik jener Umlagerung gemessen. Denn aus ihrem sich aus den kinetischen Daten ergebenden Reaktionsmechanismus konnte mit Hilfe des Prinzips der mikroskopischen Reversibilität der Mechanismus der interessierenden Umkehrreaktion, der Wanderung des Glycylrestes vom Stickstoff zum Sauerstoff, abgeleitet werden.

V. 1. Synthese des O-Glycyl-DL-serins.

Dieses nur in der Form seines Monohydrochlorids darstellbare O-Peptid wurde bereits 1954 im Rahmen der Studien zur Strukturaufklärung des Azaserins nach dem Anhydrid- und anderen Verfahren synthetisiert.²³⁾ Bei seiner Gewinnung hielten wir uns an diese Vorschrift; die hierbei nicht zu vermeidende

Verunreinigung des O-Peptids durch Glycin und Serin, welche sich elektrophoretisch einwandfrei nachweisen ließ, störte in diesem Zusammenhang nicht.

Da das bekannte Verfahren in einigen Punkten modifiziert wurde, geben wir im folgenden eine ausführliche Beschreibung der Synthese.

I. O-(Carbobenzoxymethyl)-N-carbobenzoxymethyl-DL-serin

0,01 Mol Carbobenzoxymethylglycin und 0,01 Mol Triäthylamin wurden in 20 ml abs. Tetrahydrofuran auf -15°C abgekühlt und unter Ausschluß von Wasser mit 0,01 Mol Chlorkohlensäureäthylester versetzt. Wir ließen bei -10°C stehen, wobei das Ammonchlorid ausfiel. Nach einer Stunde wurde in diese Suspension die kalte Lösung von 0,01 Mol Carbobenzoxymethylserin und 0,01 Mol Triäthylamin in 10 ml Chloroform gegossen. Das Reaktionsgemisch wurde unter Kühlung tüchtig geschüttelt, wobei sich CO_2 entwickelte. Nach eintägigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde das Lösungsmittel nach Zusatz von 10 ml Wasser im Vakuum unterhalb 40°C abgezogen und zweimal mit Chloroform nachdestilliert. Der schwach gelbe, ölige Rückstand wurde in 27 ml Methylenchlorid aufgenommen und 2 x mit je 10 ml Wasser extrahiert. Das Methylenchlorid wurde im Vak. abdestilliert und der Rückstand in 20 ml Äthylacetat gelöst, die Lösung 3 x mit je 15 ml Wasser extrahiert, die vereinigten wässrigen Auszüge mit 2n Salzsäure gegen Kongorot angesäuert, das ausgefallene Öl 3 x mit je 15 ml Äthylacetat ausgezogen und die Essigesterlösung über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vak. abgezogen und der harzige Rückstand 3 x aus Chloroform/Petroläther umgefällt.

II. O-Glycyl-DL-serin-monohydrochlorid

Das gewogene harzige Produkt (I)-1,56g- wurde in 100 ml Methanol p.A. gelöst und die klare Lösung mit 3,26 ml 1n Salzsäure (0,9 Äquivalente) versetzt. In

dieser Lösung wurden die Carbobenzoxyste bei Gegenwart von 0,3 g Pd-Mohr durch einen kräftigen Wasserstoffstrom im Laufe von 6 h abgespalten. Der Fortgang der Reaktion wurde an der CO_2 -Entwicklung kontrolliert. Eventuell gaben wir während der Katalyse noch einmal 0,1 g Pd-Mohr zu. Nach beendeter Reaktion wurde der Wasserstoff durch Stickstoff verdrängt, das Pd abfiltriert, die Lösung im Vakuum unterhalb 40° zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit 20 ml abs. Äthanol nachdestilliert. Das noch schmierige Produkt wurde in wenig dest. Wasser gerade gelöst und in der Hitze (70°) mit abs. Äthanol und schließlich mit sec. Butanol vorsichtig gefällt. Der Niederschlag wurde über Nacht unter der Lösung bei Zimmertemperatur stehen gelassen, abfiltriert und noch einmal aus wenig Wasser/abs. Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 250 mg

Fp 162°C

Das Pherogramm zeigte geringe Mengen Glycin und Serin an sowie eine sehr schwache ninhydrinpositive Zone unmittelbar hinter der breiten Zone des O-Glycylserins (in Laufrichtung). Auf den Chromatogrammen (SS 2043 b, tert. Butanol-Eisessig-Wasser (50 : 25 : 25) bzw. sec. Butanol-Ameisensäure-Wasser (750 : 133 : 117) waren nur die schwachen Zonen des Serins und Glycins sowie eine kräftige Zone des O-Glycylserins zu erkennen.

Moore und Mitarbeiter glauben, das chromatographisch nicht einheitliche Verhalten der Substanz auf die Existenz mehrerer Ionensorten, in denen das O-Glycylserin zweifellos aufzutreten vermag, zurückführen zu können. Da sich prototrope Gleichgewichte sehr schnell einstellen, scheint uns diese Erklärung nicht haltbar.

Schmelzpunkt und Infrarotspektrum stimmen mit den Angaben von Moore²³⁾ überein.

V. 2. Messung der Umlagerungsgeschwindigkeit mit Hilfe einer potentiometrischen Methode.

Wie die Vorversuche zeigten, lagert sich das O-Glycylserin in dem pH-Bereich zwischen 5 und 6 bei Zimmertemperatur innerhalb von Minuten bis Stunden bei gleichzeitiger Verminderung des pH-Wertes in das N-Glycylserin um. Bei so geringen Halbwertszeiten wäre die Analyse der bei den kinetischen Versuchen anfallenden Proben durch Chromatographie, Elektrophorese und Aktivitätsbestimmung der vor der Reaktion markierten Reaktionsteilnehmer schwierig, weil die Analyse einer Probe länger als eine Halbwertszeit der Reaktion dauerte und erst geeignete Methoden zur Arretierung des reagierenden Systems ausfindig zu machen gewesen wären. Da sich der pH-Wert der Lösung im Laufe der Reaktion erniedrigt und die Reaktionsgeschwindigkeit vom pH abhängt, war bei Aufstellung des Zeitgesetzes durch die Ermittlung der Reaktionsordnung bezüglich des reagierenden Peptids die Aufrechterhaltung eines konstanten pH-Wertes während der Reaktion zweckmäßig.

Wegen der unübersichtlichen Nebenwirkungen standen wir der Anwendung von notwendig hochkonzentrierten Pufferlösungen skeptisch gegenüber. Dagegen erhoben sich keine Bedenken, wenn der pH der Lösung durch die kontrollierte Zugabe von Lauge konstant gehalten wurde, da die Konzentration des gebildeten Salzes relativ klein und eventuelle Salzeffekte leichter zu behandeln sind als mögliche spezifische Wechselwirkungen zwischen den Peptiden und den schwachen Säuren und Basen der Pufferlösung. Überdies war damit die Möglichkeit gegeben, die Umlagerungsgeschwindigkeit aus dem Verbrauch an Alkali zu eruieren; denn die Bildungsgeschwindigkeit des Wasserstoffions muß in definierter Weise mit der Umlagerungsgeschwindigkeit des O-Peptids zusammenhängen. Im pH-Bereich zwischen 5 und 6 läßt sich die Glycylwanderung durch die Bruttogleichung



oder in guter Näherung durch



darstellen. Es ist also $m = 1$ und die Bildungsgeschwindigkeit des Wasserstoffions in Näherung ebenso groß wie die Umlagerungsgeschwindigkeit.

Damit die Aufrechterhaltung eines konstanten pH-Wertes gewährleistet war, mußte 1. ein pH-Meßgerät, das den pH-Wert während einer Zeitspanne von Stunden richtig anzeigte, 2. eine geeignete Dosiereinrichtung für die Zugabe der Lauge und 3. ein wirksames Rührsystem zur Verfügung stehen. Da die Konzentrationsänderung der gelösten Stoffe gering zu halten war, mußte die relative Volumenzunahme der Lösung bei Zugabe der Lauge möglichst klein sein.

Indem der pH potentiometrisch gemessen und relativ konzentrierte Lauge aus einer Mikrokolbenbürette der intensiv gerührten, relativ geringen Menge Lösung zugesetzt wurde, gelangen reproduzierbare und genaue Messungen.

Wegen ihres geringen Raumbedarfs wandten wir eine Einstabmeßkette an, bei welcher die als Meßelektrode fungierende Glaselektrode mit der Bezugslektrode in einem Bauteil vereinigt ist. Die benutzte Meßkette der Fa. Dr. W. Ingold, Frankfurt am Main, Typ 403, stellt eine symmetrische Anordnung mit raumsparenden und temperaturbeständigen Silber/Silberchlorid Elektroden als Bezugs- und Ableitelektrode dar. Der Innenpuffer der Glaselektrode besitzt den pH 7. Die den elektrischen Kontakt zwischen der Bezugslektrode und der zu messenden Lösung vermittelnde gesättigte KCl-Lösung wird durch einen Frittenstopfen am Ausfluß gehindert. Der Widerstand der Kette beträgt 10^8 Ohm; die Isolationswiderstände der beiden Ableitungen gegeneinander und der Eingangswiderstand des Spannungsmeßverstärkers waren diesem hohen Innenwiderstand der Meßkette angepaßt.

Zur EMK Messung wurde das Präzisions-pH-Meter p H 35 der

Fa. Knick, Berlin-Zehlendorf, benutzt. Ein besonderer Vorteil des Geräts im Zusammenhang mit dieser Aufgabe ist die über Stunden währende Konstanz seines Nullpunkts. Die Meßgenauigkeit beträgt bei dem Widerstand der verwendeten Meßkette 0,5 mV bzw. 0,01 pH Einheiten.

Das pH-Meter wurde vor jeder Messung an Steilheit und Nullpunkt der Meßkette angepaßt. Die Eichung wurde mit zwei vom National Bureau of Standards (USA) standardisierten Pufferlösungen bei Arbeitstemperatur vorgenommen, nämlich mit

0,05 molaler Kaliumhydrogenphthalatlösung (pH 4,00 bei 20°C)

und einer Lösung, deren Gehalt je

0,025 molal an KH_2PO_4 und Na_2HPO_4 (pH 6,88 bei 20°C) war. Die pH-Werte dieser Standardpuffer sind im Bereich der Versuchstemperaturen in Stufen von 5° auf $\pm 0,01$ pH mit der Wasserstoffelektrode bestimmt worden.²⁴⁾

Die Vernachlässigung der Konzentrationsabhängigkeit der Diffusionspotentiale, die an den beiden Grenzflächen der gesättigten KCl-Brücke zur Bezugselektrode auftreten, bedingt bei Absolut-pH-Bestimmungen eine Unsicherheit von etwa $\pm 0,05$ pH Einheiten gegenüber dem unter Zugrundelegung der Debye-Hückel-Theorie definierten negativen Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität.²⁵⁾ Die pH-Unterschiede ähnlich zusammengesetzter Lösungen werden mit einer Unsicherheit von $\pm 0,01$ pH Einheiten angegeben.²⁵⁾

Wie beobachtet wurde, weisen bewegte und ruhende Lösungen bei elektrometrischer pH-Messung scheinbare pH-Differenzen auf, die vermutlich auf Diffusionseffekten beruhen. Bei konstanter Rührgeschwindigkeit und gleichbleibenden geometrischen Verhältnissen war diese scheinbare pH-Verschiebung während eines kinetischen Versuchs unveränderlich und unabhängig von der Temperatur $-0,070 \pm 0,005$ pH-Einheiten. Die Potentialverschiebung wurde vor und nach jedem Versuch gemessen.

Die Unbestimmtheit der pH-Differenzen liegt deshalb bei den ausgeführten Versuchen bei $\pm 0,02$ pH und die Absolutgenauig-

keit bei $\pm 0,05$ pH Einheiten. Die Konstanz des pH-Wertes während eines kinetischen Versuches betrug mindestens $\pm 0,01$ pH Einheiten.

Das Mikrodosimeter für die zur Aufrechterhaltung eines konstanten pH-Wertes benötigte 0,1 n Natronlauge stellte eine Glasschliff-Kolbenbürette von 5 mm innerem Durchmesser und $0,5 \text{ cm}^3$ Inhalt dar, deren Kolben durch Drehen einer graduieren Mikrometerschraube vorgeschoben wurde. Die Mikrometerschraube war mit einem Schreiber, dem Titrigraphen SBR 2c der Fa. Radiometer, Kopenhagen, verbunden, so daß der Vorschub des Kolbens und damit der Verbrauch an Alkali als Funktion der Zeit aufgezeichnet werden konnte. Die Genauigkeit der Registrierung des zugesetzten Volumens an Lauge betrug 0,7%. Die Zeitaufzeichnung war über Stunden hinweg gleichförmig und die Genauigkeit der Zeitbestimmung durch den Ablesefehler bedingt, der je nach Einstellung 5 sec oder 1 min betrug. Diese Fehler fielen gegenüber der Unbestimmtheit des pH-Wertes nicht ins Gewicht.

Jeder kinetische Versuch wurde mit 5,00 ml 0,015 m wässriger Lösung des O-Glycylserin-Monohydrochlorids in einem thermostatisierten Glasgefäß von 14 ml Vol.-Inhalt, das mit einem durchbohrten Gummistopfen verschlossen war, ausgeführt. Die Temperaturkonstanz belief sich auf $\pm 0,01^\circ$. Die Kapillare des Mikrodosimeters, die Einstabmeßkette und die Führung des Rührers fanden in den Bohrungen des Stopfens Halt.

Die 0,015 m Lösung des O-Glycylserin-Monohydrochlorids wies den pH 3,5 auf. Bei zusammengestellter Versuchsanordnung wurde die Lösung durch raschen Zusatz von 0,1 n Natronlauge auf einen etwas höheren als den gewünschten pH-Wert gebracht. Sobald dieser infolge der eingetretenen Reaktion erreicht war, begann der kinetische Versuch. Der pH des reagierenden Systems wurde durch die gleichzeitige dauernde Beobachtung des pH-Meßgerätes und die manuelle Bedienung der Kolbenbürette konstant gehalten. Bei entsprechender Festlegung der äußeren Versuchsbedingungen betrugen die Halbwertszeiten 8 bis 150 min., womit ein Höchstmaß an Meßgenauigkeit

erzielt wurde. Die rasch verlaufenden Umsetzungen bei hohen Temperaturen und hohen pH-Werten wurden 8 Halbwertszeiten verfolgt, während der Fortschritt der langsamen Reaktionen mindestens eine Halbwertszeit gemessen und der für die rechnerische Auswertung benötigte Meßwert für $t = \infty$ durch Temperaturerhöhung bei konstantem pH-Wert gewonnen wurde. Wenn sich der pH der Lösung in der Nachperiode der Reaktion sichtbar nicht mehr änderte, wurden 0,5 ml der Lösung entnommen und durch Gefriertrocknung, Elektrophorese und Entwicklung der Pherogramme mit Ninhydrin analysiert. Da in keinem Fall das bei Anwesenheit deutlich nachweisbare O-Glycylserin sicher zu erkennen war, hatte sich das O-Glycylserin zu mindestens 99% in das Glycylserin umgelagert, das bei der Entwicklung der Pherogramme kräftig herauskam. Dieser Befund wurde durch die Ergebnisse bestätigt, die bei Wiederholung der geschilderten Versuche mit radioaktivem ^{14}C -O-Glycylserin gewonnen wurden. Überdies zeigen diese Versuche, daß eine Spaltung des O-Glycylserins zu den Aminosäuren neben der Umlagerung nicht stattfindet.

Da Ausgangs- und Nebenprodukte quantitativ bestimmbar waren, wurden bei der Darstellung des teuren ^{14}C -O-Glycylserins die Extraktionsschritte, welche die Ausbeute auf einen Bruchteil drückten, ausgelassen, und auf die Anwendung überschüssiger Salzsäure bei der Hydrogenolyse verzichtet, so daß schon bei der Synthese in geringem Umfang eine Umlagerung eintrat. Das Ausgangspräparat hatte die Zusammensetzung

	Probe a	Probe b
	ipm	ipm
Glycin	680	700
Glycylserin	340	400
O-Glycylserin	4130	4000

Die Analyse des Produktes, das bei der 8 Halbwertszeiten dauernden Umlagerung erhalten wurde, hatte das folgende Ergebnis:

	Probe a	Probe b
	ipm	ipm
Glycin	640	700
Glycylserin	4500	4600
O-Glycylserin	8	12

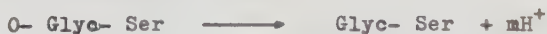
Die angegebenen Meßwerte stellen die Impulsraten nach Abzug des Zählrohr-Nulleffekts ohne Berücksichtigung des Nullpegels der elektrophoretischen Trennung und Aufarbeitung der Pherogramme, der bei 5 - 10 ipm liegt, dar.

V. 3. Ergebnisse.

Für das Zeitgesetz der intramolekularen Umlagerung bei konstantem pH liegt ein Ansatz 1. Ordnung bezüglich des O-Glycylserins nahe.

$$\frac{d [O-Glyc-Ser]}{dt} = -k [O-Glyc-Ser] \quad (8)$$

Nach der Reaktionsgleichung



folgt für die Bildungsgeschwindigkeit der Wasserstoffionen

$$\frac{d [H^+]}{dt} = -m \frac{d [O-Glyc-Ser]}{dt} \quad (9);$$

mit den Grenzbedingungen

$$[H^+]_0 = 0 \quad \text{für } t = 0,$$

$$[H^+]_{\infty} = m [O-Glyc-Ser]_0 \quad \text{für } t = \infty$$

ergibt sich bei Integration von Gl.(9) bzw. (8)

$$\ln \frac{[H^+]_{\infty} - [H^+]}{[H^+]_{\infty}} = -kt. \quad (10)$$

Bei den Reaktionen mit Halbwertszeiten $T > 50$ min. konnte $[H^+]_{\infty}$ nur dadurch ermittelt werden, daß die Reaktion durch

Temperaturerhöhung beschleunigt wurde. Wenn auch die hierbei auftretende Veränderung des Nernst-Faktors am Meßgerät kompensiert wurde und das Meßgerät konstanten pH anzeigte, blieb unsicher, ob der pH der Lösung auch bei von der Eichtemperatur abweichenden Temperaturen richtig gemessen wurde.

Die Geschwindigkeitskonstanten k wurden deshalb nicht nur nach Gl. (10), sondern auch mit Hilfe der aus Gl.(10) folgenden Beziehung²⁶⁾

$$kt; + \ln ([H^+] ; - [H^+] ;) = \text{const} \quad (11)$$

berechnet; wird mit Δ ($\Delta \lesssim T$) ein konstantes Zeitintervall bezeichnet, so bedeuten $[H^+] ;$ und $[H^+] ;$ die zur $t; \text{ bzw. } t; + \Delta$ gemessenen Wasserstoffionenkonzentrationen, (die mit dem pH der Lösung, der während der Reaktion konstant gehalten wurde, natürlich in keiner direkten Beziehung stehen). Die k -Werte wurden bei Anwendung beider Gleichungen (10), (11) graphisch gemittelt. Die Aktivierungsenergien E_A und die Aktivitätskonstanten A ergaben sich wiederum aus der durch die gemessenen k -Werte bestätigten Arrheniusschen Gleichung.

Der Fehler der Geschwindigkeitskonstanten wurde durch die Genauigkeit der pH-Messungen bestimmt. Setzt man diese wie begründet $\pm 0,02$ pH, so folgt bei Berücksichtigung der kinetischen Ordnung n in bezug auf das Wasserstoffion für den Fehler der k -Werte

$$\partial \text{pH} \approx \pm 0,02 \quad \longrightarrow \quad \frac{\partial [H^+]}{[H^+]} \approx \pm 5\%$$

$$\frac{\partial k}{k} \approx n \frac{\partial [H^+]}{[H^+]} \approx \pm 9\%$$

wiewohl der einzelne k -Wert ohne Bezugnahme auf den absoluten pH der Lösung mit etwa $\pm 1\%$ Fehlerbreite genauer bestimmt werden konnte. Die Fehler der Arrheniusschen Konstanten wurden mit Hilfe der Gl.(4) und (5) abgeschätzt.

In der folgenden Tabelle bedeuten T_∞ die nach Gl.(10) ermittelte Halbwertszeit, sowie T und k die nach Gl.(11) bestimm-

ten Größen Halbwertszeit und Geschwindigkeitskonstante.

Umlagerung des O-Glycylserins zum Glycylserin

pH	t°C	T _∞ min	τ min	k · 10 ² min ⁻¹
5,57	22,04	150	142	0,49
5,57	27,72	54	54	1,29
5,57	32,38	29,6	29,1	2,38
5,57	35,21	19,4	19,4	3,61
6,07	12,09	143	121	0,57
6,07	20,01	33,5	32,3	2,14
6,07	20,00	-	28,1	2,47
6,07	24,18	14,9	14,9	4,66
6,07	24,18	14,5	14,6	4,76
6,07	27,45	8,8	8,6	8,08

pH	E _A Kcal/Mol	log A (min ⁻¹)
5,57	27,5(± 2,0)	18,1(± 0,6)
6,07	29,3 ± 2,0	20,2 ± 0,6

Macht man für die bei konstantem pH eruierte Geschwindigkeitskonstante k den Ansatz

$$k = k_0 [H^+]^n,$$

so ergibt sich für n bei verschiedenen Temperaturen

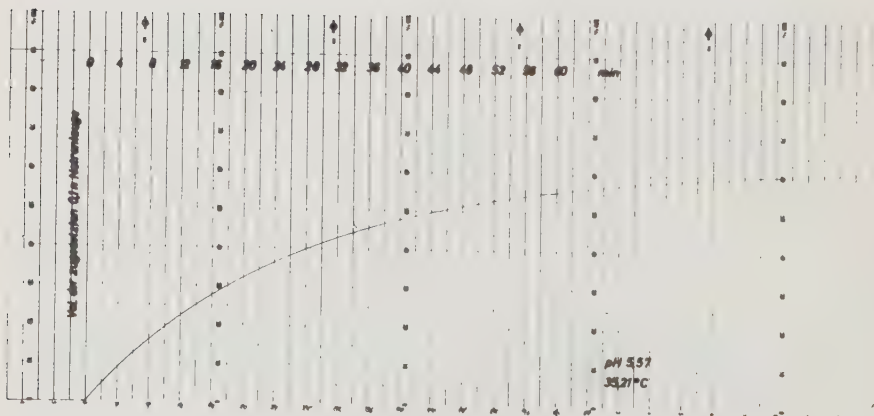
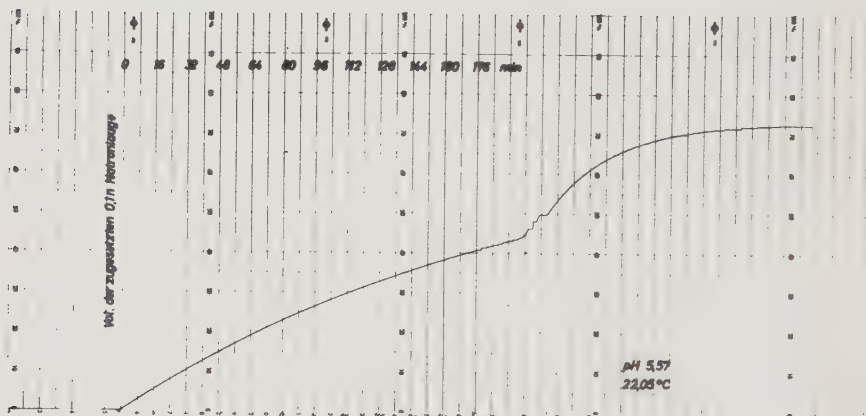
t°C	n
27,45	-1,71
24,18	-1,67
22,04	-1,65

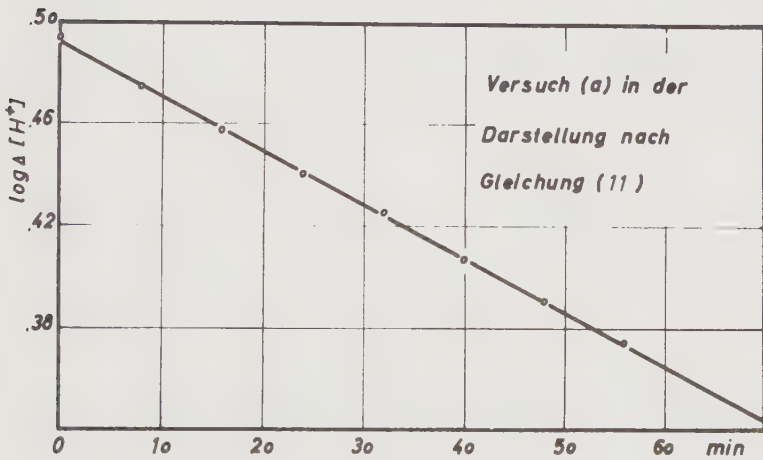
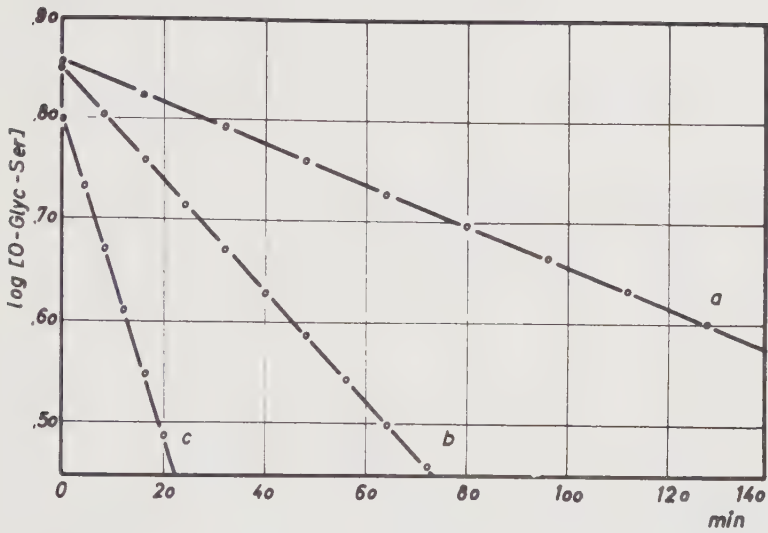
Auf den nächsten Seiten werden als typische Beispiele zwei Schreiberaufzeichnungen über den Verbrauch an 0,1 n Natron-

lauge als Funktion der Zeit und die entsprechenden nach Gl.(10) bzw. (11) erhaltenen Geraden sowie die Arrhenius-schen Geraden dargestellt.

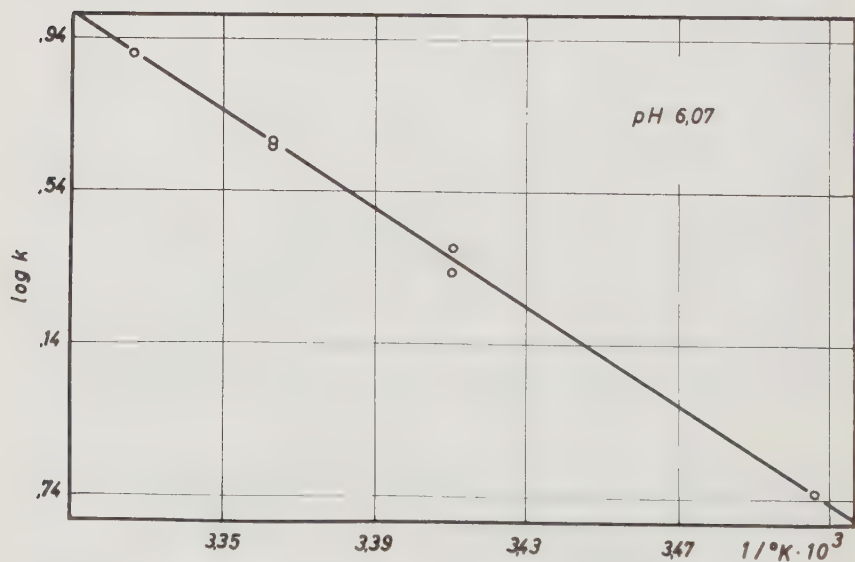
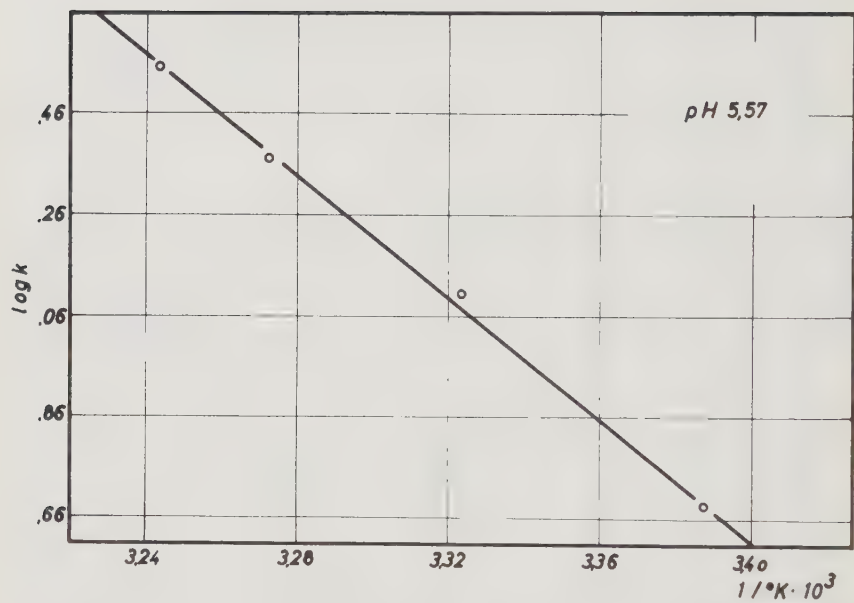
Die Meßwerte über den Verbrauch an Alkali als Funktion der Zeit von jedem kinetischen Versuch sind im Anhang tabelliert.

Zunahme der Konzentration des Glycylserins bei der Umlagerung des O-Glycylserins als Funktion der Zeit, aufgezeichnet vom Schreiber Radiometer SBR2C.





UMLAGERUNG DES O-GLYCYL-SERINS ZUM GLYCYL-SERIN
BEI pH 5,57: (a) 22,05°C, (b) 27,72°C, UND (c) 35,21°C



ARRHENIUSGERADEN DER UMLAGERUNG DES O-GLYCYL-DL-SERINS

Dritter Teil.

Diskussion der Versuchsergebnisse.

VI. Theorie des Übergangszustandes als Grundlage der Diskussion.

In diesem Abschnitt soll die Grundlage der Diskussion dargestellt werden, da die bekannten Darstellungen nicht frei von für die Konzeption der Theorie unwesentlichen, für die Behandlung konkreter Probleme jedoch gewichtiger Inkonsistenzen sind.

Stoßzahlansatz und Theorie des Übergangszustandes hängen von der Annahme ab, daß während der Reaktion das thermische Gleichgewicht der Moleküle erhalten bleibt. Die eine a priori Berechnung chemischer Reaktionsgeschwindigkeiten erlaubende Theorie des Übergangszustandes²⁷⁾ bildet für die Diskussion von Reaktivitätsproblemen die geeignetere Grundlage, nicht nur weil sie tiefer begründete Aussagen liefert, sondern auch weil der Formalismus dieser Theorie durch seine mögliche Anlehnung an die thermodynamische Begriffsbildung allgemeiner ist.

Sind an der Reaktion n ($n \geq 3$) Atome beteiligt, so stellt die potentielle Energie eine Hyperfläche im $(3n - 6)$ -dimensionalen Konfigurationsraum dar; Translation des Schwerpunktes und äußere Rotation des Komplexes sind hierbei unerheblich. Den isolierten Reaktanten und Produkten entsprechen Bereiche niedriger potentieller Energie. Diese Täler sind durch Potentialberge getrennt. Der tiefste Paß in diesem Gebiet ist der Weg, längs dessen die per definitionem ohne Änderung der Elektronenzustände sich vollziehende Reaktion abläuft. Wenn die zur Konfiguration des n -atomigen Komplexes gehörende potentielle Energie in der Umgebung des Paßsattels liegt und der Komplex sich in einem Bewegungszustand befindet, in welchem sein Bildpunkt im Konfigurationsraum den Sattel überqueren kann, so wird der Komplex ein **a k t i v i e r t e r K o m p l e x** genannt.

Die Bildpunktdichte in den verschiedenen Punkten der Energiefläche wird dem postulierten thermischen Gleichgewicht entsprechend durch den Boltzmannschen e-Satz bestimmt.

Die Anwendung des Boltzmannschen e-Satzes läßt sich nur schwer rechtfertigen, wenn die Reaktionsgeschwindigkeit eines sich nicht im chemischen Gleichgewicht befindlichen Systems behandelt wird. Daß die Geschwindigkeit der Bildung des aktivierten Komplexes aus den energiereichen Molekülen durch eine die Konzentrationen der energiereichen Moleküle enthaltende Gleichung gegeben ist, welche für den Zustand des vollständigen Gleichgewichts gilt, erscheint plausibel.²⁸⁾



Dagegen ist es fraglich, ob die Konzentrationen der energiereichen Moleküle A^* , B^* , zu den Konzentrationen der Durchschnittsmoleküle in der gleichen Beziehung wie bei vollständigem Gleichgewicht stehen. Die notwendige und hinreichende Bedingung dafür, daß die Konzentration der energiereichen Moleküle unabhängig davon ist, ob sich das System im Gleichgewicht befindet oder nicht, ist erfüllt, wenn die Geschwindigkeit der Desaktivierung groß gegen die Geschwindigkeit ist, mit der die energiereichen Moleküle durch chemische Reaktion verbraucht werden.

VI. 1. Theoretische Deutung der experimentellen Größen.

Nach diesen Bemerkungen über die in der Theorie steckenden Voraussetzungen soll versucht werden, einen Zusammenhang zwischen den empirischen Arrheniusschen Konstanten und den in der Theorie auftretenden Größen herzustellen.

In einem System idealer Gase laufe der Prozeß



ab. Die Konzentration der aktivierten Komplexe, die sich mit den Reaktanten im Gleichgewicht befänden, wenn die Reaktion

nicht abliefe, beträgt

$$c_{AB} = K \cdot c_A \cdot c_B, \quad (1)$$

worin K eine Gleichgewichtskonstante bedeutet.

Die Ortskoordinaten und die Impulse der im Phasenraum den aktivierten Komplexen entsprechenden Bildpunkte liegen im Bereich dx des ebenen Sattels bzw. im Impulsintervall von $p = -\infty$ bis $p = \infty$; die Impulse beschreiben die Bewegung längs der Koordinate x senkrecht zur kritischen Fläche. Als Reaktionsgeschwindigkeit wird die Zahl derjenigen aktivierten Komplexe pro Volumeneinheit definiert, deren Bildpunkte pro Zeiteinheit die kritische Fläche in der positiven Impulsrichtung, d.h. in Richtung der Reaktionsprodukte kreuzen:

$$v = \frac{c_{AB}}{2} \cdot \frac{\bar{p}}{y \cdot dx} \quad (2)$$

Dabei sind $\bar{p}$ der mittlere positive Impuls der Bildpunkte

$$\bar{p} = \left(\frac{2 k_B T y}{\pi} \right)^{1/2}, \quad (3)$$

y die effektive Masse bei der inneren Bewegung des Komplexes längs x und k_B die Boltzmannkonstante.

Durch Einführung der Zustandssumme für die innerkomplexe Translation auf dem ebenen Sattel

$$Z_t^* = \frac{dx}{h} (2\pi y k_B T)^{1/2} \quad (4)$$

lassen sich dx und y eliminieren. Bei Kombination der Gl.(1), (2), (3) und (4) ergibt sich

$$v = \frac{k_B T}{h} \cdot \frac{K}{Z_t^*} c_A \cdot c_B. \quad (5)$$

Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k ist dann durch die Gleichung

$$k = \frac{k_B \cdot T}{h} \cdot \frac{K}{Z_t^*} \quad (6)$$

gegeben.

Der Zusammenhang zwischen einer den aktivierten Komplex kennzeichnenden energetischen Größe und der Arrheniusschen Aktivierungsenergie E_A wird durch Vergleich der Definitionsgleichung für E_A

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{E_A}{RT^2} \quad (7)$$

und der durch logarithmische Differentiation von Gl.(6) nach T erhaltenen Beziehung

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{1}{2T} + \frac{d \ln K}{dT} \quad (6a)$$

gewonnen. Daraus ergibt sich für die hier interessierenden Reaktionen in Lösung bei konstantem Druck ²⁹⁾

$$\frac{E_A}{RT^2} = \frac{1}{2T} + \frac{\Delta H}{RT^2} + \sum_i \frac{v_i}{\partial T} \frac{\partial \ln g}{\partial T}, \quad (8)$$

worin ΔH die Standard-Reaktionsenthalpie des Aktivierungsprozesses, g die Dichte der Lösung und v_i die stöchiometrischen Äquivalenzzahlen sind. Da das letzte Glied in Gl.(8) vernachlässigt werden kann und ΔH mit der Standard-Reaktionsenergie ΔU über die Beziehung

$$\Delta H = \Delta U + \left[\left(\frac{\partial U}{\partial V} \right)_{\lambda, T} + p \right] \Delta V \quad (9)$$

zusammenhängt, kann bei Reaktionen in Lösung, bei welchen die Standard-Volumenänderung klein ist, bei 1 Atmosphäre Druck

$$\Delta H \approx \Delta U \quad (10)$$

gesetzt werden. Die Arrheniussche Aktivierungsenergie ist somit auf die Differenz der inneren Energien des aktivierten Komplexes und der Reaktanten, wobei sich die Molekülararten in Standardzuständen befinden, zurückgeführt: ^{*)}

$$E_A = \Delta U + 1/2 RT. \quad (11)$$

*) Glasstone, Laidler und Eyring erhalten an dieser Stelle

$E_A = \Delta U + RT.$ ²⁷⁾

Die Arrheniussche Aktionskonstante A läßt sich bei Reaktionen zwischen idealen Gasen bei gegebener Aktivierungsenergie am absoluten Nullpunkt ΔU_0 aus den molekularen Zustandssummen Z mit Hilfe von Gl.(6) und

$$K = \frac{Z^*}{Z_A \cdot Z_B} e^{-\Delta U_0/RT} \quad (12)$$

berechnen. Auch in Lösung können dem aktivierten Komplex und den Reaktanten bestimmbare Zustandssummen zugeordnet werden, wenn die gelösten Teilchen nicht solvatisiert sind. Die den gelösten Molekülen zugeschriebenen Zustandssummen weichen von denjenigen der gleichen Moleküle im Gaszustand lediglich um den Faktor ab, um den sich das freie Volumen in Lösung von dem in der Gasphase unterscheidet. In dieser Näherung ist die Reaktionsgeschwindigkeit cet.par. in Lösung ebenso groß wie in der Gasphase.

$$k = \frac{k_B T}{h} \cdot \frac{1}{Z_t^*} \frac{Z^*}{Z_A \cdot Z_B} e^{-\Delta U_0/RT} \quad (13)$$

Die durch die Gleichung

$$A = k e^{+E_A/RT} \quad (14)$$

definierte Arrheniussche Aktionskonstante wird mit Gl.(13)

$$A = \frac{k_B \cdot T}{h} \cdot \frac{1}{Z_t^*} \frac{Z^*}{Z_A \cdot Z_B} e^{1/2} e^{(\Delta U - \Delta U_0)/RT} \quad (15)$$

Der temperaturabhängige Anteil der Aktivierungsenergie folgt aus der Temperaturabhängigkeit der molekularen Zustandssummen.

Da über die Zustandssummen der solvatisierten Moleküle wenig bekannt ist, drückt man der einfachen Schreibweise wegen die Arrheniusschen Aktionskonstanten von Lösungsreaktionen durch die Standardentropieänderung ΔS der Aktivierung oder durch die sogenannten Aktivierungsentropien ΔS^* aus. Anstelle von Gl.(14) kann

$$A = \frac{k_B \cdot T}{h} \cdot \frac{K}{Z_t^*} e^{E_A/RT} \quad (16)$$

geschrieben werden. Wegen

$$RT \ln K = - \Delta H + T \Delta S \quad (17)$$

läßt sich Gl.(16) umformen:

$$A = \frac{k_B T}{h} \cdot e^{1/2} \cdot \frac{1}{Z_t^*} e^{\Delta S/R} \quad (18)$$

Zustandssumme und Entropie sind durch die Gleichung

$$S = RT \frac{d \ln Z}{d T} + R \ln Z \quad (19)$$

verknüpft. Die Aktivierungsentropie wird daher durch die Beziehung

$$\Delta S^* = \Delta S - \left(RT \frac{d \ln Z_t^*}{d T} + R \ln Z_t^* \right) \quad (20)$$

definiert, indem die Zustandssumme der inneren Translation des aktivierten Komplexes aus der Standardentropieänderung ΔS herausgezogen wird. Mit dieser Festlegung geht Gl.(18) in

$$A = \frac{k_B T}{h} e^{e^{\Delta S^*/R}} \quad (21)$$

über. A und somit die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k sind unabhängig von Z_t^* , und im besonderen von der unbekannten effektiven Masse des aktivierten Komplexes bei der innerkomplexen Translation sowie der Länge dx auf dem Maximum der Reaktionskoordinate.

Im A-Faktor bimolekularer Reaktionen ist die von der Stoßtheorie gelieferte Zahl Z' der Zusammenstöße pro Volumen- und Zeiteinheit enthalten. Z' läßt sich aus Gl.(15) bzw. (21) separieren, indem die Reaktanten als Atome und der aktivierte Komplex als ein zweiatomiges Molekül behandelt werden. Z' beträgt bei Zimmertemperatur und durchschnittlichen Molekülkonstanten $10^{11} - 10^{12}$ l/Mol.sec.⁵⁰⁾

VI. 2. Kompensationseffekt.

Variiert man bei der Hydrolyse einer Peptidbindung unter sonst konstanten Bedingungen die als Bindungspartner auftretenden Aminosäuren, so wird beobachtet, daß die Zunahme der Arrheniusschen Aktivierungsenergie mit einem Zuwachs der Aktivitätskonstanten verknüpft ist.^{10,12)} Da durch die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen diese Gesetzmäßigkeit wiederum bestätigt wurde und von Bedeutung ist, ob die Möglichkeit eines Kompensationseffektes in die Diskussion der Meßergebnisse einbezogen werden kann, soll geprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen Zustandssummen und Aktivierungsenergien in einer Klasse übersichtlicher, reagierender Systeme besteht.

Ein übersichtliches Modell für ein reaktionsfähiges System ist der durch die Morsefunktion

$$U = D \left(1 - e^{-a(r - r_e)} \right)^2 \quad (22)$$

definierte anharmonische Oszillator, der bereits von Rüetschi als Modell zur Behandlung des Kompensationseffektes herangezogen wurde.³¹⁾ Um zu der mit Hilfe des Ansatzes

$$\Delta U = \Delta U_0 + B \Delta U_0 T \quad (23)$$

aus Gl.(15) hervorgehenden Beziehung

$$\ln A \sim \Delta U_0 \quad (24)$$

zu gelangen, wurde ein Zusammenhang zwischen Schwingungsentropie und Aktivierungsenergie ausgeschlossen.

Die gequantelten Niveaus der Gesamtschwingungsenergie E ergeben sich als Funktion der Quantenzahl v durch Lösung der Wellengleichung nach Einführung der durch Gl.(22) dargestellten potentiellen Energie zu³²⁾

$$\frac{E}{(hc)} = w \left(v + \frac{1}{2} \right) - q \left(v + \frac{1}{2} \right)^2 \quad (25)$$

worin h das Plancksche Wirkungsquantum, c die Lichtgeschwindigkeit und w die jener Frequenz entsprechende Wellenzahl bedeuten, die der anharmonische Oszillator für eine Schwingung mit infinitesimaler Amplitude in klassisch physikalischem Sinne besäße; wird mit γ die reduzierte Masse des Oszillators bezeichnet, so ist q durch die Beziehung

$$q = \frac{h}{8 \pi^2 c} \cdot \frac{a^2}{\gamma} \quad (26)$$

gegeben. Die Quantenzahl v_D , mit der das Termkontinuum beginnt, und w sind durch die klassische Dissoziationsenergie D bestimmt:

$$D = \frac{w^2}{4q}, \quad (27) \quad v_D = \left(\frac{w}{2q} - 1/2 \right). \quad (28)$$

Die Zustandssumme des anharmonischen Oszillators

$$Z = e^{-E_0/RT} + e^{-E_1/RT} + \dots + e^{-D/RT} \quad (29)$$

nimmt mit steigendem w und damit bei konstantem q mit steigender Dissoziationsenergie D ab. Die Zunahme der Zahl der Terme infolge des Ansteigens von v_D ist hierbei unerheblich. Wenn v_D um 1 wächst, nimmt w nach Gl.(28) um $2q$ zu:

$$w' = w + 2q. \quad (30)$$

Entsprechend erhöht sich die Dissoziationsenergie:

$$D' = \frac{(w + 2q)^2}{4q}. \quad (31)$$

Da in der Zustandssumme der Term

$$e^{-D'/RT}$$

zusätzlich auftritt und alle anderen Glieder bei Erhöhung der Dissoziationsenergie abnehmen, genügt nachzuweisen, daß die Abnahme eines Gliedes der Summe dem Betrage nach größer

ist als der Zusatzterm. Die der Nullpunktsenergie

$$E_0 = 1/2 w - 1/4 q \quad (32a)$$

bzw.

$$E'_0 = 1/2 w + q - 1/4 q \quad (32b)$$

zugehörigen Glieder der Zustandssumme differieren um mehr als $\exp(-D/RT)$

$$e^{-hc(1/2 w - 1/4 q)/RT} (1 - e^{-hc q/RT})$$

$$- hc \frac{(w+2q)^2}{4q} / RT$$

$$> e \quad ,$$

da $q \ll w$ und $hcq \geq 1/20 RT$. Die Wellenzahlen $(w - 2q)$ der C = N - und C - N - Grundschiwingung liegen bei etwa 1600 bzw. 1100 cm^{-1} (18) und die entsprechenden Anregungsenergien bei 4,6 bzw. 3,2 Kcal/Mol. Da die Dissoziationsenergien 138 und 73 Kcal/Mol betragen ¹⁹⁾, resultieren für die Bindungen C = N und C - N nach Gl.(27) die Beziehungen

$$w = 120 q \quad (C = N), \quad w = 91 q \quad (C - N),$$

woraus sich für

$$hcq \rightarrow 0,038 \text{ Kcal/Mol} \quad (C = N)$$

$$\text{bzw.} \quad hcq \rightarrow 0,035 \text{ Kcal/Mol} \quad (C - N)$$

$$\text{ergeben.} \quad [1 - \exp(-0,05) \approx \exp(-3,0)]$$

Diese Rechnung mit empirischen Molekülkonstanten ohne Prüfung der unterstellten Voraussetzung, daß die potentielle Energie der Bindungspartner durch eine Morsefunktion darstellbar ist, soll lediglich die Grenzwerte der Größenverhältnisse deutlich machen.

Die bisherigen Betrachtungen bezogen sich auf den Zusammenhang zwischen klassischer Dissoziationsenergie D und Zustands-

summe Z. Da die wahre Dissoziationsenergie D_0

$$D_0 = D - 1/2 w + 1/4 q \quad (33)$$

wegen Gl.(27) und $w > 4q$ mit steigender klassischer Dissoziationsenergie immer zunimmt, fällt Z auch mit wachsendem D_0 .

Die nach Gl.(15) lautende Arrheniussche Aktionskonstante dieser hypothetischen Reaktion

$$A = \frac{k_B \cdot T}{h} \cdot e^{1/2} \cdot \frac{1}{Z} \quad (34)$$

nimmt mit steigender Arrheniusscher Aktivierungsenergie

$$E_A = D_0 + 1/2 RT \quad (35)$$

zu. Dieser Zusammenhang bleibt auch bei Berücksichtigung der Temperaturabhängigkeit der Aktivierungsenergie bestehen. Hierbei erhalten die obigen Gl. die Form

$$A = \frac{k_B \cdot T}{h} \cdot \frac{1}{Z} \cdot e^{(E_A - D_0)/RT} \quad (34a)$$

bzw.

$$E_A = D_0 + (E_A - D_0), \quad (35a)$$

so daß sich eine Veränderung des temperaturabhängigen Terms $(E_A - D_0)$ in gleicher Weise auf E_A und A auswirkt.

Die anharmonischen Oszillatoren, bei deren Dissoziation unter gleichen Versuchsbedingungen ein Kompensationseffekt zu beobachten ist, besitzen als gemeinsames Merkmal den gleichen Wert der die Form des Potentials beschreibenden Konstanten q . Sind überdies der Atomabstand r_e bei $T = 0$ und a unveränderlich, so ist der Atomabstand, bei dem die potentielle Energie und damit die Gesamtenergie der Oszillatoren einen bestimmten Bruchteil der Dissoziationsenergie darstellt, konstant.

Bei der Bildung des Übergangszustandes der Hydrolyse von Carbonsäurederivaten $\text{Go} - \text{X} -$ geht das Carbonylkohlenstoffatom vom trigonalen in den tetragonalen Valenzzustand über. Erfahrungsgemäß ist die Aktivierungsenergie dieses Prozesses umso höher, je stärker der Doppelbindungscharakter der $\text{C} - \text{X} -$ Bindung ist (Chloride, Ester, Amide). Da die Schwingungsfrequenz der $\text{C} - \text{X} -$ Valenzschwingung bei gleichem X mit steigender Bindungsenergie wächst, nimmt die entsprechende Zustandssumme mit steigender Bindungsenergie ab. Bei der Spaltung der Peptidbindung sollte sich dieser Zusammenhang im symbaten Gang der Arrheniusschen Größen E_A und A kundtun.

Außerdem erhöht sich bei Bildung des Übergangszustandes die Zahl der Freiheitsgrade der inneren Rotation, womit ein umso höherer Gewinn an Anordnungsmöglichkeiten und damit an Entropie verknüpft ist, je starrer das Peptidmolekül im Ausgangszustand war.

Die Deutung des Kompensationseffektes als Folge der Abhängigkeit der Stoßzeit zweier Moleküle von der Höhe des zu überwindenden Potentialberges gelang Hartmann. Der verblüffend einfachen Lösung dieses höchst verwickelten Problems legt Hartmann die auf der Konstanz der Atomradien beruhende Erfahrung zugrunde, daß die Wirkungssphäre a des Abstoßungspotentials gleicher Atome unabhängig von dessen Höhe U ist. Begreift man als Stoßzeit diejenige Zeit, welche vom Eintritt des einen Stoßpartners in das abstoßende Kraftfeld des anderen bis zum Erreichen der Sphäre maximaler potentieller Energie verstreicht, so ergibt sich bei Annahme eines konstanten Gradienten der potentiellen Energie für die Stoßzeit

$$T \sim \frac{1}{(U)^{1/2}} \quad (36)$$

Bekanntlich lauten die Lösungen der Newtonschen Gleichung für die Bewegung gegen eine konstante Kraft

$$\begin{aligned}x &= A + Bt + Ct^2, \\ \dot{x} &= B + 2Ct, \\ \ddot{x} &= 2C.\end{aligned}\tag{37}$$

Bei Formulierung der geschilderten Bedingungen

$$\begin{aligned}\ddot{x}_m &= - \frac{dU}{dx} = - \frac{U}{a}, \\ \dot{x} &= 0 \quad \text{für } t = T, \\ \dot{x} &= \left(\frac{2U}{m} \right)^{1/2} \quad \text{für } t = 0,\end{aligned}\tag{38}$$

folgt aus Gl.(37) der Zusammenhang (36).

Die Wahrscheinlichkeit zur Wechselwirkung des stoßenden Atoms mit den Nachbarn des attackierten Atoms wächst mit zunehmender Stoßzeit. Wenn es zur Wechselwirkung kommt, ist ein Energieverlust des mit überdurchschnittlicher kinetischer Energie ausgestatteten Stoßpartners wahrscheinlich. Mit wachsender Stoßzeit wird somit die Wahrscheinlichkeit, daß die Stoßpartner sich bis auf den Abstand maximaler potentieller Energie nähern, kleiner. Dies bedeutet, daß die Wahrscheinlichkeit einer Reaktion, Erfüllung der Energiebedingung vorausgesetzt, mit fallender Stoßzeit und damit nach Gl.(32) mit steigender Aktivierungsenergie wächst.

Bei Variation der Wechselwirkung der Reaktanten und des aktivierten Komplexes mit dem umgebenden Medium kann ebenfalls eine gleichzeitige Erhöhung von Aktivierungsenergie und Aktivierungsentropie eintreten, wobei die Aktivierungsenergie relativ unempfindlich gegen eine Veränderung des Reaktionsmediums ist. Nach der Brönsted-Hückelschen Theorie sollte die Aktivierungsenergie und Aktivierungsentropie bei Reaktionen zwischen gleichsinnig geladenen Ionen linear mit der Wurzel aus der Ionenstärke ansteigen; die Zunahme der Aktivierungsenergie fällt hierbei gegenüber dem Zuwachs der Aktivierungsentropie nicht ins Gewicht.³³⁾

Es wäre jedoch unzutreffend, anzunehmen, daß in einer Reihe verwandter Reaktionen die Arrheniusschen Größen stets einen

sympaten Gang aufweisen. Wenn nämlich strukturelle sterische Effekte die Geschwindigkeiten vergleichbarer Reaktionen erheblich beeinflussen, so läuft einer Erhöhung der Aktivierungsenergie wegen Eindellung abgeschlossener Elektronenschalen eine Erniedrigung der Aktionskonstanten als Folge der Behinderung der inneren Rotation parallel. In solchen Fällen der sterischen Hinderung ist der möglicherweise auftretende Kompensationseffekt verdeckt. Kürzlich beschrieb F. Becker den Einfluß der sterischen Hinderung bei der Bildung und Hydrolyse von gesättigten aliphatischen Carbonsäureestern mit Hilfe der von Pitzer eingeführten sterischen Verteilungsfunktion - ohne Berücksichtigung eines Kompensationseffektes und ohne Beachtung der möglichen Behinderung der inneren Rotation durch das Lösungsmittel - auf befriedigende Weise. ³⁴⁾

VII. Diskussion der bei der Hydrolyse der Peptidbindung erhaltenen Versuchsergebnisse.

Das wesentliche Ergebnis der experimentellen Untersuchungen ist die Beobachtung, daß die Hydrolyse des Glycylserins und Alanylserins in rein-wässriger Lösung außerordentlich rasch verläuft, einmal im Hinblick auf die Hydrolyse des Glycylalanins in rein-wässriger Lösung und zum zweiten im Vergleich zur Hydrolyse des Alanylserins bzw. Glycylalanins in 0,5 n Salzsäure.

Medium	Substanz	$k_{760} \cdot (d^{-1})$	E_A Kcal/Mol	$\log A$ (d^{-1})
Wasser	Glyc-Ser	$1,3 \cdot 10^{-1}$	23,8	14,0
Wasser	Ala-Ser	$2,3 \cdot 10^{-1}$	-	-
Wasser	Glyc-Ala ³⁵⁾	$< 1 \cdot 10^{-3}$	> 27	> 14
0,5n HCl	Ala-Ser	$2,7 \cdot 10^{-1}$	23,3	14,0
0,5n HCl	Glyc-Ala ¹⁰⁾	$1,8 \cdot 10^{-1}$	20,2	11,9
0,5n HCl	Ala-Glyc ¹⁰⁾	$1,3 \cdot 10^{-1}$	21,3	12,5

Bevor versucht wird, eine Deutung dieses Befundes zu geben, sollen die bei der Hydrolyse in salzsaurer Lösung gewonnenen Resultate analysiert werden.

VII. 1. Hydrolyse in saurer Lösung.

Das Zeitgesetz der Hydrolyse des Alanylserins in 0,5 bis 2,0n Salzsäure ergab sich in Näherung zu

$$-\frac{d[\text{Peptid}^+]}{dt} = k[\text{H}^+][\text{Peptid}^+] \quad (1)$$

Da nach neueren Erfahrungen die Assoziationsgeschwindigkeit prototroper Reaktionen durch die Diffusionsgeschwindigkeit der Reaktionspartner bestimmt wird (Weller, Eigen³⁶⁾), sollte das Wasserstoffion am zeitbestimmenden Schritt der

Peptidhydrolyse nicht beteiligt sein. Das beobachtete Zeitgesetz wird deshalb durch die Annahme gedeutet, daß der Peptidspaltung ein protolytisches Gleichgewicht vorgelagert ist.

$$K = \frac{[\text{H- Peptid}^{2+}]}{[\text{H}^+] [\text{Peptid}^+]}$$
 (2)

Macht man für den zeitbestimmenden Schritt der Hydrolyse den Ansatz

$$- \frac{d [\text{Peptid}^+]}{dt} = k_0 [\text{H- Peptid}^{2+}] ,$$
 (3)

so ergibt sich für die gemessene Geschwindigkeitskonstante k

$$k = k_0 K .$$
 (3a)

Eine formal exakte Wiedergabe der Versuchsergebnisse dürfte durch den bei niedrigen Ionenstärken bewährten Ansatz von Brönsted (1923) zu erzielen sein, nach dem im Sinne der späteren Theorie des Übergangszustandes die Geschwindigkeit der Reaktion der Konzentration des sich mit den Reaktanten im Gleichgewicht befindenden aktivierten Komplexes proportional ist:



$$- \frac{d [\text{Peptid}^+]}{dt} = k^{\ddagger} [\text{A}] .$$
 (4)

Bei Elimination von $[\text{A}]$ und Vergleich des erhaltenen Ausdrucks mit Gl.(1) erhält man

$$- \frac{d [\text{Peptid}^+]}{dt} = k [\text{H}^+] [\text{Peptid}^+] \cdot \left(\frac{f_{\text{H}} \cdot f_{\text{P}} \cdot f_{\text{H}_2\text{O}}}{f_{\text{A}}} \right) ,$$
 (5)

worin f_{H} , f_{P} , $f_{\text{H}_2\text{O}}$ und f_{A} die molaren Aktivitätskoeffizienten des Wasserstoffions, Peptidions, des Wassers und des aktivierten Komplexes bedeuten. Tatsächlich werden die Versuchsergebnisse besser durch die Gleichung

$$-\frac{d[\text{Peptid}^+]}{dt} = k a_{\text{H}^+} [\text{Peptid}^+] \quad (5a)$$

wiedergegeben als durch Gl.(1), wobei unter a_{H^+} die mit dem mittleren Aktivitätskoeffizienten der Salzsäure multiplizierte Konzentration der Wasserstoffionen verstanden wird

$$a_{\text{H}^+} = [\text{H}^+] f_{\pm} \quad (5b)$$

Da die individuellen, thermodynamisch nicht definierten Aktivitätskoeffizienten nur so lange den mittleren gleichgesetzt werden können, wie die individuellen Ioneneigenschaften zurücktreten, sind in 1n oder 2n Salzsäure nach Gl.(5b) nur Näherungswerte für die Wasserstoffionenaktivitäten zu erwarten.

$[\text{H}^+]_{20^\circ\text{C}}$ Mol/l	$f_{\pm}^{37)}$ (32°C)	a_{H^+} Mol/l	$k_{32^\circ}/[\text{H}^+]$ $\text{l.Mol}^{-1}\text{d}^{-1}$	$k_{32^\circ}/a_{\text{H}^+}$ $\text{l.Mol}^{-1}\text{d}^{-1}$
0,5	0,76	0,38	$4,28 \cdot 10^{-3}$	$5,6 \cdot 10^{-3}$
0,6	0,77	0,46	$4,36 \cdot 10^{-3}$	$5,7 \cdot 10^{-3}$
1,0	0,82	0,82	$4,96 \cdot 10^{-3}$	$6,1 \cdot 10^{-3}$
2,0	1,03	2,06	$6,65 \cdot 10^{-3}$	$6,5 \cdot 10^{-3}$

Da der Aktivitätskoeffizient des Wassers mit steigender Ionenstärke sicher abnimmt, läßt sich der Befund, daß die auf die Einheit der Wasserstoffionenaktivität bezogenen Geschwindigkeitskonstanten mit steigender Ionenstärke zunehmen, deuten, indem man dem zweifach positiv geladenen Übergangskomplex gegenüber den getrennten einfach positiv geladenen Reaktanten eine zunehmende Stabilität mit wachsender Ionenstärke zuschreibt. Es ist dies eine dem primären Salzeffekt analoge Erscheinung.

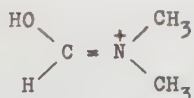
In diesem Zusammenhang weisen wir auf die Beobachtung hin, daß unter den Bedingungen der Gefriertrocknung eine teilweise Umlagerung des N-Peptids zum O-Peptid stattfindet, während in

0,6 n Salzsäure ein einwandfreier Nachweis für die Umlagerung nicht gelang. Im Laufe der Gefriertrocknung konzentriert sich die Salzsäure, wobei gleichzeitig die Aktivität des Wassers so weit abnimmt, daß die konzentrierte Salzsäure zwar die ohne wesentliche Beteiligung des Wassers sich vollziehende Umlagerung ermöglicht, wegen der geringen Aktivität des Wassers aber keine Hydrolyse herbeiführt. Während die Geschwindigkeit der Umlagerungsreaktion mit steigender Chlorwasserstoffkonzentration rasch wächst, scheint die Hydrolysegeschwindigkeit ein Maximum zu durchlaufen. In 0,6 n Salzsäure ist der Nachweis der Umlagerung schwierig, weil sich das gebildete O-Peptid schnell hydrolysiert und seine stationäre Konzentration gering ist.

Aus dem Zeitgesetz leitet sich die Bruttoformel des Übergangszustandes

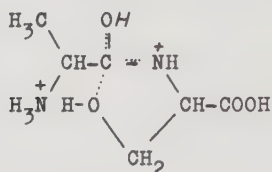


ab. Da in wässriger Lösung das Wassermolekül und die alkoholische Hydroxylgruppe des Serins bei der Anlagerung an das Carbonylkohlenstoffatom konkurrieren, sind die Strukturen zweier Übergangszustände zu formulieren, nämlich für die Umlagerung, die bei der Spaltung über das O-Peptid der langsamere Schritt ist, und für die direkt verlaufende Hydrolyse. Das Carbonylkohlenstoffatom geht bei beiden Reaktionen aus dem trigonalen in den tetragonalen Valenzzustand über. Dies wird durch die bekannte Struktur von Orthocarbonsäureestern und den von Bender nachgewiesenen Austausch des Carbonylsauerstoffatoms durch ein solches des Wassers während der Hydrolyse bewiesen. Da im Spektrum der magnetischen Kernresonanz das Methyldublett des in stark saurer Lösung protonisierten N,N-Dimethylformamids erhalten bleibt, besitzt die C-N-Bindung auch unter diesen Bedingungen starken Doppelbindungscharakter,

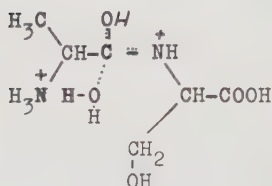


was nur bei einer Protonisierung des Sauerstoffs möglich ist; diese Form ist damit nicht notwendig die kinetisch wichtige.

Übergangszustand der Umlagerung



Übergangszustand der direkten Hydrolyse



Da dem zeitbestimmenden Schritt der Hydrolyse ein protolytisches Gleichgewicht vorgelagert ist, setzt sich die Arrheniussche Aktivierungsenergie E_A additiv aus der Aktivierungsenergie E des zeitbestimmenden Schrittes und der Bildungsenthalpie ΔH des Amidiniumions zusammen. Bei logarithmischer Differentiation nach der Temperatur geht Gl.(3a) in die Beziehung

$$E_A = E + \Delta H \quad (6)$$

über. Die induktive Wirkung von Substituenten auf E_A dürfte nach Gl.(6) und, wie aus der Struktur des Übergangszustandes der Peptidhydrolyse zu schließen ist, gering sein. Denn die durch den Substituenteneffekt verursachten Änderungen der Aktivierungsenergie E und der Bildungsenthalpie ΔH besitzen entgegengesetztes Vorzeichen. Die Hydroxygruppe des Serins als positivierender Substituent bedingt eine Erniedrigung von E und eine Erhöhung von ΔH .

Die Zunahme der Arrheniusschen Aktivierungsenergie E_A der Hydrolyse des Alanylserins in 0,5 n Salzsäure gegenüber derjenigen des Alanylglycins oder Glycylalanins

	E_A (Kcal/Mol)
Glycylalanin	20,2
Alanylglycin	21,3
Alanylserin	23,3

führen wir ebenso wie den Zuwachs von E_A beim Übergang vom Glycylalanin zum Alanylglycin auf eine Erhöhung der Aktivierungsenergie E infolge verstärkter gegenseitiger sterischer Hinderung der Atome in allen Konformationen des Übergangskomplexes zurück. Setzt man voraus, daß die Spaltung der Peptide nach dem gleichen Mechanismus erfolgt, so scheint der hohe Betrag von E_A der Hydrolyse des Alanylserins aus dem Rahmen zu fallen. Möglicherweise wird diese Verschiebung der Aktivierungsenergie durch den erhöhten Raumbedarf der hydratisierten - CH_2OH - Gruppe verursacht.

Die Möglichkeit, daß die Hydrolyse des Serinpeptids in saurer Lösung über das entsprechende O-Peptid abläuft, soll nicht außer Acht gelassen werden. Da sich die Versuchsergebnisse gut durch die Arrheniussche Beziehung darstellen lassen, sollten entweder die Aktivierungsenergien der beiden möglichen Wege gleich groß oder bei verschiedenen Aktivierungsenergien ein Reaktionsweg gegenüber dem anderen zu vernachlässigen sein. Da die beobachtete Aktivierungsenergie wenn auch nur mit Vorbehalt dem direkten Reaktionsweg zugeordnet werden kann, sollten die Aktivierungsenergien für den Umlagerungsprozeß und die direkte Hydrolyse etwa gleich groß sein, wenn die Umlagerung bei der Spaltung des Peptids eine Rolle spielt. In Ermangelung definierter Maßzahlen für den induktiven Effekt seien die pK-Werte relevanter Carbonsäuren angeführt,

	pK (25°C) 38)
H- $\text{CH}_2\cdot\text{COOH}$	4,8
$\text{HOOC}(\text{CH}_2)_2\text{-CH}_2\cdot\text{COOH}$	4,4

aus deren Abstufung sich eine etwas geringere Reaktivität der Hydroxygruppe des Serins gegenüber der des Wassers ableitet. Da die Bildung des Hydroxyoxazolidinringes außerdem wegen der Tatsache, daß der Cyclopentanring um etwa 6 - 7 Kcal/Mol instabiler als eine sterisch völlig ungehinderte Verbindung ist ¹⁹⁾, sterisch geringfügig erschwert sein dürfte, ist für die Umlagerung eine relativ hohe Aktivierungsenergie zu erwarten. Die gemessene Aktivierungsenergie läßt sich daher zwanglos der Umlagerungsreaktion zuordnen.

Die Arrheniussche Aktionskonstante für die saure Hydrolyse des Alanylserins zeichnet sich durch einen ungewöhnlich hohen Wert aus.

	$A \text{ (d}^{-1}\text{)}$	$k_{760} \cdot 10^1 \text{ (d}^{-1}\text{)}$
Alanylserin	$1 \cdot 10^{14}$	2,7
Alanylglycin	$3 \cdot 10^{12}$	1,3
Glycylalanin	$9 \cdot 10^{11}$	1,8

Dieser bedingt, daß die Hydrolyse des Alanylserins trotz erheblich höherer Aktivierungsenergie schneller fortschreitet als die Spaltung der beiden anderen Peptide. Der hohe Betrag der Aktionskonstanten kann durch den Kompensationseffekt allein nicht erklärt werden, da auch bei seinem Vorliegen der Gang der Geschwindigkeitskonstanten durch die Abstufung der Aktivierungsenergien bestimmt wird. ^{10,12)}

Dem empirischen Zeitgesetz entsprechend ist die Aktionskonstante in einen dem protolytischen Gleichgewicht und einen dem zeitbestimmenden Reaktionsschritt zugehörigen Faktor aufzuteilen.

Die Aktionskonstante A_0 des zeitbestimmenden Schrittes ist durch die Gleichung

$$A_0 = k_0 e^{E/RT} \quad (7)$$

definiert, woraus sich wegen

$$K = e^{\Delta S/R} \cdot e^{-\Delta H/RT} \quad (8)$$

und Gl.(3a) für die gemessene Aktionskonstante

$$A = A_0 e^{\Delta S/R} \quad (9)$$

ergibt; ΔS ist die Standardentropieänderung bei der Bildung des Amidiniumions.

Es erhebt sich die Frage, ob die beobachteten Abstufungen der A-Faktoren durch die Unterschiede der Bildungsentropien der betreffenden Amidiniumionen hervorgerufen werden. Diese sind bisher nicht gemessen worden. Da sich Vorzeichen und in Näherung auch der Betrag der Bildungsentropien der Aminosäure-Ammoniumionen allein durch die Berücksichtigung der elektrostatischen Wechselwirkung der Ladungen e_1 und e_2 in dem Medium Wasser mit der Dielektrizitätskonstanten $D = 80$ bestimmen lassen,

$$\Delta G_e = \frac{e_1 \cdot e_2}{D r} \cdot N_L, \quad (10)$$

$$\Delta S_e = - \frac{\partial \Delta G_e}{\partial T} = \frac{N_L \cdot e_1 \cdot e_2}{r \cdot D} \cdot \frac{\partial \ln D}{\partial T}, \quad (11)$$

wenn man für den Abstand r zwischen der $\text{COO}^\ominus$ -Gruppe und der $\text{NH}_3^\oplus$ -Gruppe den bei der Röntgenstrukturanalyse der Aminosäuren im festen Zustand ermittelten Wert von $3\text{\AA}$ einsetzt, sollten sich die Bildungsentropien der Amidiniumionen, die sich durch die Ladung, aber nicht wesentlich durch die Struktur von den ins Auge gefaßten Ammoniumionen unterscheiden, mit Hilfe von Gl.(11) abschätzen lassen. Setzt man die entsprechenden Werte in Gl.(11) ein, $e_1 = e_2 = \text{Elementarladung}$, $r = 3\text{\AA}$, $\partial \ln D / \partial T = -0,0046$,²⁷⁾ so erhält man für die Bildungsentropie des Amidiniumions

$$\Delta S \approx -7 \text{ cal/Grad.Mol.}$$

Zum Vergleich sei die gemessene Bildungsentropie des aus dem positiven Ammoniumion und dem Wasserstoffion gebildeten zweifach positiv geladenen Äthylendiammoniumions, das die gleiche

Ladungsverteilung wie das Amidiniumion besitzen dürfte, zitiert: $\Delta S = - 5,1 \text{ cal/Grad.Mol.}$ ³⁹⁾

Die auf die feineren Strukturunterschiede ihrer Bausteine zurückzuführenden Differenzen der Bildungsentropien der Amidiniumionen dürften nicht größer als die Abstufungen der Bildungsentropien der als Bausteine fungierenden Aminosäure-Ammoniumionen sein.³⁸⁾

	ΔS cal/Grad.Mol
Glycin	9,4
Alanin	8,3
Serin	7,2

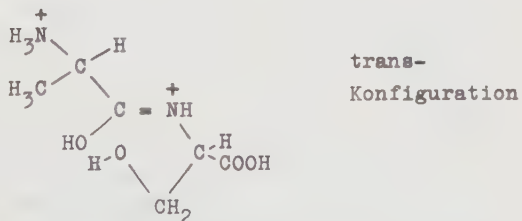
Aus dieser Übersicht geht hervor, daß die Zunahme der Entropie durch Verringerung der Solvation bei der Bildung der Zwitterionen aus den Aminosäureanionen und Wasserstoffionen erwartungsgemäß beim Serin kleiner als beim Alanin und Glycin ist. Aus dem gleichen Grunde dürfte daher die Abnahme der Entropie bei der Bildung des Amidiniumions des Alanylserins geringer sein als im Falle des Alanylglycins. Bildet man die $\Delta \Delta S$ -Werte und setzt diese in Gl.(9) ein, so resultiert zwar eine Zunahme der Arrheniusschen Aktionskonstanten beim Übergang vom Alanylglycin zum Alanylserin, jedoch nur um den Faktor e und nicht, wie beobachtet, um den Faktor 100. Die gemessene Zunahme der Aktionskonstanten entspricht einer Entropiedifferenz von rund 9 cal/Grad Mol.

Zur Rechtfertigung der Anwendung von Gl.(11) ist eine Bemerkung notwendig. Die aus der Kontinuumsvorstellung heraus durchgeführte Auswertung jener Gl. mit Hilfe der makroskopischen Dielektrizitätskonstanten des reinen Lösungsmittels und ihrer Temperaturabhängigkeit liefert sicher nur Näherungswerte für ΔS_e , im besonderen wenn der Abstand der Ladungen in der Anfangs- oder Endphase der Zustandsänderung nur wenige Wasser-Molekül-Durchmesser beträgt. Da es in diesem Zusammenhang nur auf Vorzeichen und Größenordnung der Zustandsgrößen ankommt, verzichten wir auf eine Auswertung der Ver-

suche, die Gl.(10) bzw. (11) durch Berücksichtigung der eingeschränkten Beweglichkeit der Wassermoleküle in der Umgebung der Ionen zu korrigieren.

Wenn sich der Einfluß der CH_2OH -Gruppe bei der Anlagerung des Protons an die Amidbindung nur in geringem Maße auf die Bildungsentropie des Amidiniumions geltend macht, dann ist noch weniger mit einer die Aktionskonstante A_0 erhöhenden Wirkung bei Aufrichtung des Übergangszustandes zu rechnen. Denn es ist unwahrscheinlich, daß der Übergangskomplex stärker hydratisiert ist als das zweifach positiv geladene Amidiniumion. Da, wie geschildert, die gemessene Zunahme der Arrheniusschen Aktivierungsenergie auf das Ansteigen der Aktivierungsenergie des langsamen Reaktionsschrittes als Folge sterischer Abstoßung im Übergangszustand zurückgeführt wird, ist wegen der Entropie - Energie - Relation bei sterischen Effekten eher eine Abnahme als eine Zunahme der Aktionskonstanten A_0 zu erwarten.

Vollzieht sich die Spaltung des Alanylserins über den Oxazolidinring, so kann der hohe Betrag der Aktionskonstanten durch eine relativ hohe Stoßzahl zwischen dem Sauerstoffatom der Serinhydroxygruppe und dem Carbonylkohlenstoffatom erklärt werden. Die hohe Stoßzahl wird durch eine für den Stoß günstige, schon im Ausgangszustand energetisch bevorzugte Konformation des Peptids, bei welcher der Carbonylkohlenstoff gegen Stöße durch Wassermoleküle teilweise abgeschirmt ist, ermöglicht.



Gestützt wird diese Anschauung durch die Beobachtung, daß in konzentriert salzsaurer Lösung -unter den Bedingungen der Ge-

friertrocknung - die der hohen Salzsäurekonzentration entsprechende Reaktionsgeschwindigkeit der Umlagerung des Alanylserins nachgewiesen wurde. Daß die Umlagerung unter diesen Bedingungen beobachtbar ist, wird, wie dargelegt, auf die für die Spaltung des gebildeten Esters zu geringe Aktivität des Wassers zurückgeführt.

Indem wir die durch die mitgeteilten Versuchsergebnisse begründete Annahme machen, daß sich das Alanylserin zu einem erheblichen Teil auf dem Reaktionsweg über das reaktive, während der Reaktion im stationären Zustand verharrende O-Peptid hydrolysiert, werden die beobachteten Zeitgesetze erfüllt:

$$-\frac{d[\text{Peptid}^+]}{dt} = k [\text{H}^+] [\text{Peptid}^+], \quad (12)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{O-Peptid}^{2+}]}{dt} &= k [\text{H}^+] [\text{Peptid}^+] \\ &\quad - k' [\text{H}^+] [\text{O-Peptid}^{2+}] \\ &= 0, \end{aligned} \quad (13)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{Glycin}]}{dt} &= k' [\text{H}^+] [\text{O-Peptid}^{2+}] \\ &= k [\text{H}^+] [\text{Peptid}^+]. \end{aligned} \quad (14)$$

Wie bisher impliziert, können die gemessenen Größen Geschwindigkeitskonstante, Aktivierungsenergie und Aktionskonstante der Umlagerungsreaktion zugeordnet werden.

VII. 2. Hydrolyse der Peptidbindung in neutraler Lösung.

Da sich die Ergebnisse der kinetischen Messungen in saurer Lösung durch ein Zeitgesetz der Form

$$v = k [\text{Peptid}^+] [\text{H}^+]$$

darstellen lassen, spielt die nichtkatalysierte Hydrolyse in

saurer Lösung keine bedeutende Rolle. Diese Tatsache dürfte durch eine relativ hohe Aktivierungsenergie der ohne Beteiligung des Wasserstoffions ablaufenden Hydrolyse bedingt sein; denn die Aktionskonstanten sollten bei Außerachtlassung eines Kompensationseffektes, nach der Struktur und Ladungsverteilung in den Übergangs- und Ausgangszuständen zu schließen, etwa gleich groß sein. Die in einer Erniedrigung der Aktivierungsenergie bestehende katalytische Wirkung der Wasserstoffionen ist im Hinblick auf die durch die Anlagerung des Protons an den Sauerstoff hervorgerufene Verringerung der Ladungsdichte am Carbonylkohlenstoffatom verständlich. Führt man die Hydrolyse in reinem Wasser bei pH 5 - 6, dem isoelektrischen Bereich der Peptide, durch, so ist eine weitere Erhöhung der Aktivierungsenergie gegenüber derjenigen der nicht-katalysierten Reaktion in saurer Lösung wegen der in diesem pH-Bereich negativ geladenen Carboxylgruppe zu erwarten. Da überdies in der Arrheniusschen Aktivierungsenergie der sauren Hydrolyse die Bildungsenthalpie des Amidiniumions steckt, ist die Arrheniussche Aktivierungsenergie der Neutralreaktion um 3 Terme höher als jene. Tatsächlich verläuft die Hydrolyse des Glycylalanins außerordentlich langsam. Aus den Meßergebnissen von J. Fernandez ergeben sich die folgenden Werte der kinetischen Größen für die Hydrolyse des Glycylalanins in neutraler Lösung:

	T_{78}°	E_A	$\log A$
	d	Kcal/Mol	(d^{-1})
Glycyl-alanin	> 400	> 27	> 14
Glycyl-serin	4,2	23,8	14,0

Bemerkenswerterweise wandelt sich das Glycylalanin unter den Bedingungen der neutralen Hydrolyse unter Bildung einer Peptidbindung in das cyclische Anhydrid, ein Diketopiperazin, um, so daß die Analyse der Hydrolysate erschwert ist. Im Gegensatz dazu hydrolysiert sich das Glycylserin in rein wässriger Lösung unerwartet rasch praktisch ohne Störung durch Nebenreaktionen.

Die Arrheniussche Aktivierungsenergie der nichtkatalysierten Reaktion ist nicht nur gegen sterische Hinderung der Atome im Übergangszustand, sondern auch gegen induktive Einflüsse durch dem Carbonylkohlenstoffatom benachbarte Atomgruppen empfindlich, im Gegensatz zu E_A der durch H^+ katalysierten Hydrolyse. Die im Vergleich zur Methylgruppe positivierende Wirkung der CH_2OH -Gruppe kommt in den unterschiedlichen Dissoziationsenthalpien der Ammoniumgruppen des Alanins und Serins zum Ausdruck³⁸⁾:

	ΔH (Kcal/Mol)	ΔS (cal/Grad.Mol)
Alanin	11,0	- 8,3
Serin	10,4	- 7,2

In den Differenzen der Dissoziationsentropien spiegelt sich das unterschiedliche Hydrationsvermögen wider, das beim Serin größer als beim Alanin ist. Die durch den induktiven Effekt hervorgerufene Erniedrigung der Aktivierungsenergie sollte deshalb durch die Erhöhung der sterischen Abstoßungsenergie infolge des vergrößerten Raumbedarfs der hydratisierten CH_2OH -Gruppe mindestens zum Teil ausgeglichen werden. Der geringe Betrag der Arrheniusschen Aktivierungsenergie der Hydrolyse des Glycyl-serins in rein wässriger Lösung ist daher unverständlich, wenn man annimmt, daß die Hydrolyse der betrachteten Peptide nach dem gleichen Mechanismus ohne die intermediäre Bildung von Zwischenkörpern verläuft.

Obwohl nach bisherigem Wissen unwahrscheinlich war, daß der zweite Reaktionsweg, die Spaltung des Serinpeptids über das O-Peptid, bei der Hydrolyse in wässriger Lösung von pH 5 - 6 beschritten wird, war diese Reaktionsmöglichkeit ins Auge zu fassen.

Wie geschildert, stellt sich das Gleichgewicht zwischen dem Glycylserin und dem O-Glycyl-serin in wässriger Lösung, deren pH im isoelektrischen Bereich des Glycylserins liegt, rasch ein. Da im Gleichgewicht die Konzentration des O-Peptids höchstens 1/100 der Konzentration des N-Peptids beträgt, muß sich die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante der O-Peptid-

spaltung mindestens auf das 100-fache des k-Wertes der N-Peptidspaltung belaufen, wenn der vom O-Peptid ausgehende Reaktionsweg bei der Hydrolyse des N- bzw. O-Peptids in einem ins Gewicht fallenden Ausmaß beschriftet wird. Eine direkte Prüfung dieser Voraussetzung ist wegen der Lage und der raschen Einstellung des Gleichgewichts nicht möglich; nach den bei der Synthese von Serinpeptiden gemachten Erfahrungen über die Labilität von Esterbindungen in Carbobenzoxypeptidestern dürfte die Bedingung erfüllt sein.

Für die Kinetik des Zerfalls des Glycylserins über das O-Glycylserin wird der folgende, mit dem empirischen Zeitgesetz konsistente Ansatz gemacht:

$$v = - \frac{d [\text{Glyc-Ser}]}{dt} = - \frac{d [\text{O-Glyc-Ser}]}{dt} ,$$

$$v = k [\text{O-Glyc-Ser}] . \quad (15)$$

Eliminiert man $[\text{O-Glyc-Ser}]$ aus Gl.(15) und dem Massenwirkungsgesetz für die Umwandlung des N-Peptids in das O-Peptid

$$K = \frac{[\text{Glyc-Ser}] [\text{H}^+]}{[\text{O-Glyc-Ser}]} , \quad (16)$$

so ergibt sich

$$v = \frac{k}{K} [\text{H}^+] [\text{Glyc-Ser}] . \quad (17)$$

Da die Hydrolyse in reinem Wasser ausgeführt wurde, ist $[\text{H}^+]$ durch die beiden Dissoziationskonstanten des Glycylserins gegeben

$$[\text{H}^+] = (K_1 \cdot K_2)^{1/2} . \quad (18).$$

Diese Gleichung stellt die hier brauchbare und hinreichende Näherung des Ausdrucks

$$[\text{H}^+]^2 = \frac{K_1 \cdot (K_2 \cdot A + K_W)}{A + K_1} \quad (18a)$$

dar, worin A die Gesamtkonzentration der beiden Formen des

Glycylserins mit der Gesamtladung Null und K_w die Dissoziationskonstante des Wassers bedeuten.³⁸⁾ Bei Elimination von $[H^+]$ in Gl.(17) erhält man mit Gl.(18)

$$v = k \cdot \frac{(K_1 \cdot K_2)^{1/2}}{K} [\text{Glyc-Ser}] \quad (19)$$

Diese Gleichung ist nur so lange gültig, wie die Acidität der Lösung durch das Glycylserin bestimmt wird, also exakt nur im Zeitpunkt Null des kinetischen Versuchs. Da die isoelektrischen Punkte des Glycins, Serins und Glycylserins dicht beisammen liegen (bei 25°C: 5,97,⁴⁰⁾ 5,68,⁴⁰⁾ 5,65²²⁾), ändert sich der pH-Wert während eines kinetischen Versuches praktisch nicht, so daß Gl.(19) auch im weiteren Verlauf der Hydrolyse ihre Gültigkeit behält. Die vollständige Gleichung, welche die geringe Änderung des pH-Wertes während der Hydrolyse beschreibt, ergibt sich aus den 6 Dissoziationskonstanten der 3 Ampholyte, ihren Konzentrationen und der Elektroneutralitätsbedingung; sie besitzt eine komplizierte, für die Versuchsauswertung unbrauchbare Form. Tatsächlich verläuft die Hydrolyse des Glycylserins über mehrere Halbwertszeiten hinweg nach einem Zeitgesetz 1. Ordnung bezüglich des Ausgangs-peptids.

Die Arrheniussche Aktivierungsenergie E_A ist gemäß Gl.(19) aus den Dissoziationsenthalpien ΔH_1 und ΔH_2 des Glycylserins, der Reaktionsenthalpie ΔH der Umlagerung und der Aktivierungsenergie E der O-Peptidspaltung zusammengesetzt

$$E_A = E + 1/2 (\Delta H_1 + \Delta H_2) - \Delta H. \quad (20)$$

Wird $\Delta H_1 = 1$ Kcal/Mol, $\Delta H_2 = 10$ Kcal/Mol, und $\Delta H = 3$ Kcal/Mol gesetzt, so erhält man mit $E_A = 23,8$ Kcal/Mol für

$$E = 21 \text{ Kcal/Mol.}$$

Um einen Anhaltspunkt für die Größenordnung der Aktivierungsenergie der Esterspaltung in neutraler Lösung zu besitzen, werden die Arrheniusschen Aktivierungsenergien der Hydrolyse des Glycylalanins in alkalischer, saurer und neutraler Lösung sowie die Arrheniusschen Aktivierungsenergien der Spaltung

des Essigsäureäthylesters in alkalischer und saurer Lösung zitiert.

	Hydrolyse		
	alkalisch	sauer	neutral
E_A (Glyc-Ala) [Kcal/Mol]	12) 15	10) 20	35) >27
E_A (Äthylacetat) [Kcal/Mol]	30) 11	41) 16	

Da die Differenzen der Aktivierungsenergien bei gleichem Substrat wesentlich auf den unterschiedlichen nucleophilen Eigenschaften der hydrolysierenden Agenzien beruhen, dürfte ein Wert von etwa 21 Kcal/Mol für die Spaltung einer Esterbindung in neutraler Lösung nicht aus dem Rahmen fallen.

Aufgrund dieser Überlegungen ist nicht auszuschließen, daß ein erheblicher Teil des Glycylserins auch in rein wässriger Lösung auf dem über das O-Glycylserin verlaufenden Reaktionsweg hydrolysiert wird. Diese Reaktionsweise ist wahrscheinlich, weil die gemessene Arrheniussche Aktivierungsenergie dem möglichen anderen direkten Reaktionsweg nicht oder nur mit besonderen Zusatzannahmen zugeordnet werden kann.

VIII. Die Umlagerung des Serinpeptids.

Bei der Diskussion der bei der Hydrolyse von Serinpeptiden erhaltenen Versuchsergebnisse ist die Möglichkeit der intermediären Umlagerung der Peptide ebenso zu berücksichtigen, wie die bei der Hydrolyse gewonnenen Erkenntnisse in die Diskussion über den Mechanismus der Umlagerung einzubeziehen sind.

Zunächst werden die gemessenen kinetischen Daten der O → N - Glycylwanderung besprochen und im folgenden die aus diesen Ergebnissen und dem Prinzip der mikroskopischen Reversibilität ableitbaren Schlußfolgerungen bezüglich der Umkehrreaktion dargestellt.

VIII. 1. Die Wanderung des Glycylrestes vom Sauerstoff zum Stickstoff.

Da eine Diskussion des Reaktionsmechanismus ohne Kenntnis der Bruttoreaktion nicht möglich ist, soll vor Besprechung der kinetischen Daten die Stöchiometrie der Reaktion



untersucht werden.

Bezeichnen wir mit h_o bzw. h_n die Zahl der Protonen, die von einem Mol O-Peptid bzw. N-Peptid bei dem betreffenden pH abgespalten sind, so gilt bei Berücksichtigung der Tatsache, daß das O-Peptid 3 und das N-Peptid 2 dissoziationsfähige Gruppen enthält,

$$\begin{aligned} m &= (3 - h_o) - (2 - h_n) \\ &= 1 + (h_n - h_o) . \end{aligned} \quad (21)$$

Da das N-Peptid AH_2 nur zwei innere Dissoziationskonstanten K_1 und K_2 besitzt

$$K_1 = \frac{[\text{AH}] [\text{H}^+]}{[\text{AH}_2]} , \quad K_2 = \frac{[\text{A}] [\text{H}^+]}{[\text{AH}]} , \quad (22)$$

läßt sich h_n leicht ausrechnen:

$$h_n = [AH] + 2 [A]. \quad (23)$$

Eliminiert man $[AH]$ und $[A]$ mit Hilfe von

$$1 = [AH_2] + [AH] + [A] \quad (24)$$

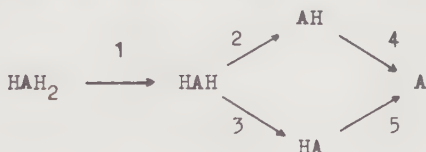
und Gl.(22) mit 22)

$$K_1 = 8,7 \cdot 10^{-4} \text{ und } K_2 = 5,9 \cdot 10^{-9}$$

(für 25°C), so erhält man für h_n bei pH 5,6

$$h_n = 1,00.$$

Etwas langwieriger gestaltet sich die Berechnung von h_o . Das O-Peptid AH_3 besitzt nämlich gemäß dem Schema



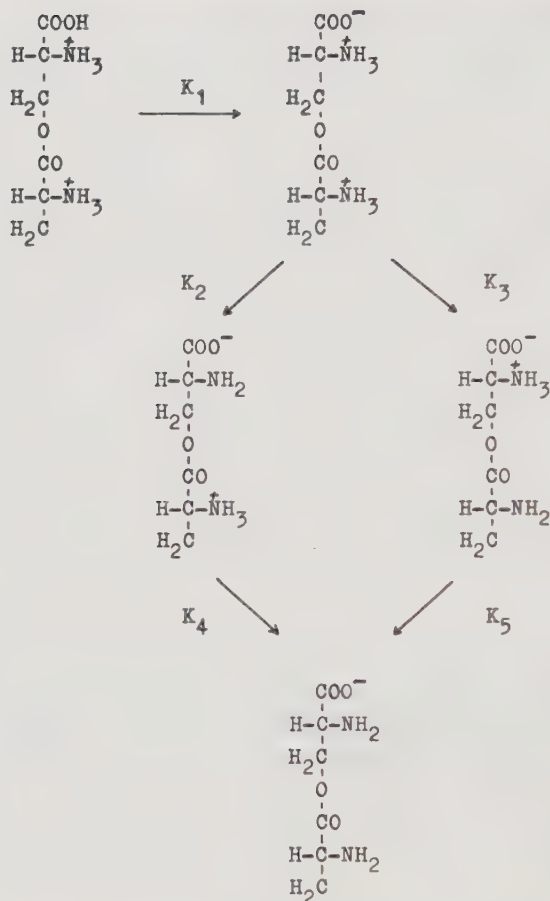
5 innere Dissoziationskonstanten, (s. Dissoziationsschema); da K_1 sicher um mehr als 3 Zehnerpotenzen von den übrigen K-Werten abweicht, genügt zur Beschreibung der Dissoziation der Carboxylgruppe eine Gleichgewichtskonstante K_1 .

$$\begin{aligned}
 K_1 &= \frac{[HAH] [H^+]}{[AH_3]}, & K_2 &= \frac{[AH] [H^+]}{[HAH]}, \\
 K_3 &= \frac{[HA] [H^+]}{[HAH]}, & K_4 &= \frac{[A] [H^+]}{[AH]}, \\
 K_5 &= \frac{[A] [H^+]}{[HA]}.
 \end{aligned} \quad (25)$$

Wie direkt einzusehen ist, gilt

$$K_2 K_4 = K_3 K_5. \quad (25a)$$

Dissoziationschema des O-Glycylserins



Da die einzelnen Gleichgewichtskonstanten nicht bekannt sind, wurden die K-Werte des O-Peptids aus seiner Struktur abgeschätzt.

$$pK_1 \leq pK_1 \text{ (Serin)} = 2,2^{38)},$$

pK_2 berechnet ,

$$pK_3 \leq pK \text{ (Glycinmethylester)} = 7,7^{38)},$$

$$pK_4 = pK_2 \text{ (Glycylserin) } = 8,2^{22),}$$

$$pK_5 = pK_2 \text{ (Serin) } = 9,2^{38)}.$$

$$K_1 = 10^{-2}, \quad K_2 = 2 \cdot 10^{-9}, \quad K_3 = 2 \cdot 10^{-8},$$

$$K_4 = 5 \cdot 10^{-9}, \quad K_5 = 5 \cdot 10^{-10}.$$

h_0 , die Zahl der Protonen, die ein Mol O-Peptid bei pH 5,6 und bei 25°C abspaltete, ist somit

$$h_0 = [HAH] + 2[AH] + 2[HA] + 3[A]. \quad (26)$$

Durch Umformung der Gl.(25), (26) und

$$1 = [HAH_2] + [AH] + [HA] + [A] + [HAH] \quad (27)$$

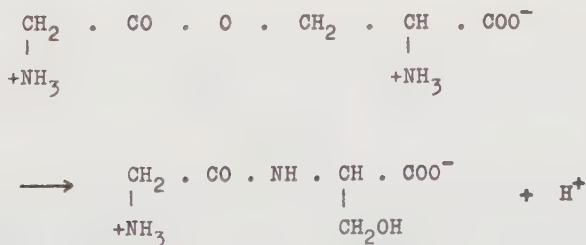
ergibt sich

$$h_0 = 1,01.$$

Die Zahl m der Protonen, welche bei einem Molumsatz der Umlagerung des O-Peptids zum N-Peptid frei wird, ist somit

$$m = 1,0.$$

Die Umlagerung kann somit in guter Näherung durch die Gleichung



dargestellt werden; bei pH 5,6 und bei 25°C betragen die Konzentrationen dieser Ionensorten 99 % bzw. 99,5 % der Gesamtkonzentration des O-Peptids bzw. N-Peptids. Im Massenwirkungsgesetz dieser Reaktion können daher in hinreichender Näherung die Konzentrationen der bestimmten Ionensorten durch die analytischen Konzentrationen der Peptide ersetzt

werden.

$$K = \frac{[\text{Glyc-Ser}] [\text{H}^+]}{[\text{O - Glyc - Ser}]} \quad (28)$$

Bei pH 5,6 wandelt sich das O-Peptid so weit in das N-Peptid um, daß jenes nach elektrophoretischer Trennung nicht mehr einwandfrei erkennbar ist; die Gleichgewichtskonzentration des O-Peptids kann höchstens gleich 1/100 derjenigen des N-Peptids sein. Für die Gleichgewichtskonstante ergibt sich somit ein unterer Grenzwert von

$$K \geq 3 \cdot 10^{-4}$$

Bei pH 3,6 sollten sich nach Gl.(28) die Gleichgewichtskonzentrationen des N-Peptids und des O-Peptids mindestens wie 1 : 1 verhalten. Das O-Peptid erwies sich jedoch in wässriger Lösung von pH 3,6 als stabil; die Gleichgewichtseinstellung ist daher bei diesem niedrigen pH verzögert.

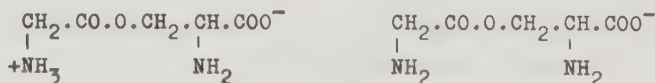
Gültigkeit des Ansatzes

$$k = k_0 [\text{H}^+]^n \quad (29)$$

für die gemessene Geschwindigkeitskonstante k der Umlagerung vorausgesetzt, ergab für die kinetische Ordnung in bezug auf das Wasserstoffion bei pH 5,6

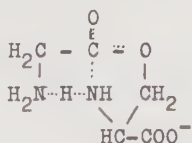
$$n = -1,7$$

Die Metastabilität des O-Peptids bei pH 3,6 und die Diskrepanz zwischen stöchiometrischer Äquivalenzzahl und kinetischer Ordnung bezüglich des H^+ deuten darauf hin, daß die Umlagerung des O-Peptids bei pH 5,6 durch OH^- katalysiert wird. Die kinetisch wichtige Ionensorte des O-Peptids ist somit fast vollständig deprotonisiert. Die Nichtganzzahligkeit der kinetischen Ordnung wird durch die Annahme interpretiert, daß mindestens zwei Ionensorten des O-Peptids an der Umlagerung beteiligt sind:



Die Feststellung, daß die kinetisch wichtige Form des Ausgangs-peptids und damit der Übergangskomplex vollständig deprotonisiert ist, überrascht, denn im allgemeinen wird eine Transacylierung durch dem Carbonylkohlenstoffatom benachbarte, positivierende Substituenten beschleunigt. Zur Deutung dieser Beobachtung sind 3 Möglichkeiten in Betracht zu ziehen: 1. Die Verzögerung der Umlagerung durch die Glycinammoniumgruppe, 2. die Beschleunigung der Umlagerung durch die Glycinaminogruppe und 3. die Überlagerung beider Effekte.

Die Umlagerung kann dadurch behindert werden, daß 1. durch die elektrostatische Anziehung zwischen der Carboxylat- und der Ammoniumgruppe die Aufrichtung der cyclischen Hydroxy-oxazolidinstruktur erschwert ist und 2. der nucleophile Charakter der das Carbonyl-C-Atom angreifenden Aminogruppe wegen Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke stark geschwächt ist. Bei der hohen Acidität der Ammoniumwasserstoffatome und der ausgeprägten Basizität der NH_2 -Gruppe dürfte dieser Effekt durchaus ins Gewicht fallen. Wie noch erörtert werden wird, dürfte von besonderer Bedeutung die reaktionsbeschleunigende Wirkung der freien Glycinaminogruppe sein, indem sie als Acceptor des Protons der attackierenden Aminogruppe fungiert und damit deren Nucleophilität erhöht. Wir schreiben daher dem Übergangskomplex der Umlagerung (in beiden Richtungen) die folgende Struktur zu:



Nach diesen Betrachtungen über die Stöchiometrie und Struktur des Übergangskomplexes soll der molekularkinetische Ansatz formuliert werden, der zum empirischen Zeitgesetz führt und eine Diskussion der Arrheniusschen Größen ermöglicht.

Die zeitliche Änderung der analytischen Konzentration des O-Peptids dC/dt sei gleich der Summe der zeitlichen Konzentrationsänderungen der vollständig deprotonisierten Form A und

der einbasigen Form AH (s.o.!))

$$\begin{aligned} \frac{dC}{dt} &= \frac{d[A]}{dt} + \frac{d[AH]}{dt} \\ &= -k_2[A] - k_1[AH] . \end{aligned} \quad (30)$$

Werden $[A]$ und $[AH]$ durch die Konzentration der zweibasigen Ionensorte AH_2 ausgedrückt

$$\frac{dC}{dt} = - \left(k_2 \cdot \frac{K_2 \cdot K_4}{[H^+]^2} + k_1 \cdot \frac{K_2}{[H^+]} \right) [AH_2] \quad (31)$$

und $[AH_2] = C$

gesetzt, so ergibt sich wegen

$$\frac{dC}{dt} = - \left(k_2 \frac{K_2 \cdot K_4}{[H^+]^2} + k_1 \cdot \frac{K_2}{[H^+]} \right) C \quad (32)$$

für die gemessene Geschwindigkeitskonstante

$$k = k_2 K_2 \cdot K_4 [H^+]^{-2} + k_1 K_2 [H^+]^{-1} . \quad (33)$$

Sind k_a und k_b die gemessenen Geschwindigkeitskonstanten bei den Wasserstoffionenkonzentrationen $[H^+]$ und $A' [H^+]$, so wird in Anlehnung an Gl.(33)

$$k_a = \frac{x \cdot a}{[H^+]^2} + \frac{x}{[H^+]} , \quad (34a)$$

$$k_b = \frac{xa}{A'^2 [H^+]^2} + \frac{x}{A' [H^+]} \quad (34b)$$

gesetzt. Durch algebraische Umformung ergibt sich

$$a = [H^+] \cdot A' \frac{B - A'}{A'^2 - B} , \quad (35)$$

worin

$$B = k_a / k_b$$

bedeutet. Die Meßwerte lauten:

$$A' = 3,16,$$

$$B = 8,08 : 1,13 = 7,16 \quad (\text{bei } 27,45^\circ\text{C}).$$

Das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten der durch die Glycinaminogruppe katalysierten (k_2) und nichtkatalysierten Reaktion (k_1) wird durch Vergleich der Beziehungen (33), (34) und (35) erhalten:

$$k_2 = 760 k_1 .$$

Die Beiträge des in $[H^+]$ quadratischen und des linearen Terms

$$k = \frac{x}{[H^+]} \left(A' \frac{B - A'}{A'^2 - B} + 1 \right) \quad (36)$$

$$k = \text{const} \quad (4,5 + 1)$$

ergeben, daß 82 % des O-Glycyl-serins auf dem durch die Beteiligung der Glycinaminogruppe gekennzeichneten Reaktionsweg gespalten werden.

Das empirische Zeitgesetz kann daher in Näherung durch die Gleichung

$$-\frac{d[\text{O-Glyc-Ser}]}{dt} \approx k_2 \frac{K_2 \cdot K_4}{[H^+]^2} [\text{O-Glyc-Ser}] \quad (37)$$

dargestellt werden. Die Arrheniussche Aktivierungsenergie E_A setzt sich dann additiv aus der Aktivierungsenergie E der Umlagerung und den Dissoziationsenthalpien ΔH_1 und ΔH_2 der beiden Ammoniumgruppen des O-Peptids zusammen.

$$E_A \approx E + \Delta H_1 + \Delta H_2 . \quad (38)$$

Mit den Werten $\Delta H_1 \approx \Delta H_2 \approx 10 \text{ Kcal/Mol}$ ergibt sich E zu

$$E \approx 8 \text{ Kcal/Mol} .$$

Dieser Betrag der Aktivierungsenergie für die intramolekulare $O \rightarrow E$ - Glycylwanderung ist im Vergleich zu den Aktivierungsenergien für die Hydrolyse von Peptidbindungen, die bei Spaltung in alkalischer Lösung etwa 15 Kcal/Mol ¹²⁾ und in saurer Lösung etwa 20 Kcal/Mol ¹⁰⁾ betragen, sehr niedrig. Vergleicht man jedoch diesen Wert mit der Aktivierungsenergie für die alkalische Hydrolyse der Esterbindung, die für Essigsäureäthylester und Essigsäurebutylester sich auf 11,3 bzw. 11,4 Kcal/Mol ³⁰⁾ beläuft, und berücksichtigt man außerdem, daß die Nucleophilität der Aminogruppe im allgemeinen stärker ausgeprägt ist als diejenige des Hydroxylions, so erscheint der geringe Wert der Aktivierungsenergie nicht ungewöhnlich, aber doch bemerkenswert. Die sterische Behinderung der Atome im Hydroxyoxazolidingerüst scheint wie bei der Umkehrreaktion in saurer Lösung nur eine geringe Rolle zu spielen.

Die durch die Gleichung

$$A = k_2 e^{E/RT} \quad (39)$$

definierte Arrheniussche Aktionskonstante ergibt sich zu

$$A \approx 1 \cdot 10^8 \text{ sec}^{-1}$$

Da die Aktivierungsentropie wegen der Einbuße an inneren Rotationsfreiheitsgraden bei der Ringschließung, die durch den Gewinn an Schwingungsfreiheitsgraden nicht wettgemacht werden dürfte, negativ sein sollte, ist nach der Theorie des Übergangszustandes die Aktionskonstante mit einem Betrag

$$A < 10^{13} \text{ sec}^{-1}$$

wegen

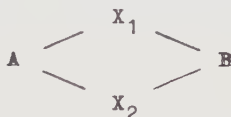
$$A = \frac{k_B T}{h} \cdot e^{e} \cdot e^{\Delta S^* / R}$$

zu erwarten. Außerdem dürfte der Unterschied der Wechselwirkung des Wassers mit dem offenen Peptid einerseits und dem stärker polaren Übergangskomplex andererseits als Folge der eingeschränkten Beweglichkeit der im Übergangszustand zusätzlich gebundenen Wassermoleküle einen negativen Term zur Aktivierungsentropie beitragen.

VIII. 2. Die Wanderung des Glycylrestes vom Stickstoff zum Sauerstoff.

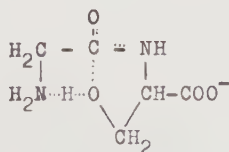
Nach Besprechung der gemessenen kinetischen Daten der $O \longrightarrow N$ - Peptidylwanderung soll untersucht werden, ob Aussagen über den Umkehrprozeß, die Umwandlung des N-Peptids zum O-Peptid möglich sind, wobei wir uns auf die Reaktion in Lösung von pH 5 - 6 beschränken.

Nach dem Prinzip der mikroskopischen Reversibilität verläuft im Gleichgewicht jeder molekulare Prozeß im Durchschnitt ebenso schnell wie sein Umkehrprozeß. (Tolman)



Wenn daher die Umwandlung von A nach B unter bestimmten Bedingungen vorwiegend über X_1 verläuft, so vollzieht sich der Umkehrvorgang ebenfalls zur Hauptsache über X_1 . Da nach der Theorie des Übergangszustandes der Übergangszustand einer Reaktion unabhängig davon ist, ob sich das System im Gleichgewicht befindet oder nicht, gilt das Prinzip auch für Reaktionen in Systemen, die nicht im Gleichgewicht sind.

Die $N \longrightarrow O$ - Glycylwanderung sollte demnach über den gleichen Übergangszustand geschehen wie die Gegenreaktion. Seine Struktur wird durch die Formel



dargestellt, welche die Bindungen zwischen den Atomen, aber nicht die Projektion ihrer räumlichen Anordnung symbolisiert. Anschaulich und im wesentlichen richtig dürfte die Struktur des aus der trans - Konfiguration des Peptids heraus gebildeten Übergangszustands durch die Stuartschen Kalottenmodelle

wiedergegeben werden.

Mit Hilfe einer Reihe von Annahmen läßt sich die Reaktionsenthalpie ΔH_0 der Umlagerung



abschätzen. Die Aktivierungsenergie, die zur Bildung des Übergangskomplexes der Umlagerung vom N - Glyc - Ser - Anion ausgehend aufgewendet werden muß, dürfte in Näherung der Aktivierungsenergie der alkalischen Hydrolyse des Glycylalanins gleich sein; dies ergibt sich durch Vergleich der Strukturen der betreffenden Ausgangs- und Übergangszustände.

$$E (N \longrightarrow O - \text{Glyc} - \text{Ser}) \approx 15 \text{ Kcal/Mol.}$$

Die Arrheniussche Aktivierungsenergie sollte sich bei pH 5,6 auf etwa 25 Kcal/Mol belaufen, da das bei pH 5,6 praktisch vollständig als Zwitterion vorliegende Glycylserin deprotonisiert werden muß, bevor es den betrachteten Übergangszustand bilden kann, wozu etwa 10 Kcal/Mol erforderlich sind. Die Umwandlung des N-Peptids in das O-Peptid ist demnach bei pH 5,6 ein schwach exothermer Prozeß, und der Umkehrvorgang (40) ein schwach endothermer: $\Delta H_0 \approx 3 \text{ Kcal/Mol.}$

Der obere Grenzwert der freien Standard-Enthalpie ΔG_0 ergibt sich aus der Gleichgewichtskonstanten (Gl.28) zu $\Delta G_0 \leq 5 \text{ Kcal/Mol.}$ Da die Bildung des Glycylserins wegen des Doppelbindungscharakters der C - N - Bindung und der damit eingeschränkten freien Drehbarkeit mit einer Entropieabnahme verknüpft sein dürfte, sollte gelten

$$3 \leq \Delta G_0 \leq 5 .$$

Die Entropieänderung, welche durch die Ladungstrennung bei der Bildung des Glycylserins gemäß Gl.(40) verursacht wird, dürfte gering und etwa ebenso groß wie die Dissoziationsentropie der α -Ammoniumgruppe des Lysins sein: $\Delta S = - 2 \text{ cal/Mol Grad.}$ ⁴⁰⁾ Setzt man $\Delta G_0 = 4 \text{ Kcal/Mol,}$ so ergibt sich das Verhältnis der Konzentration des Glycylserins zu der des O-Glycylserins im Gleichgewicht bei 300°K und pH 5,57 zu 470.

Diese Überlegungen zeigen, daß aus dem ungewöhnlich raschen und anscheinend quantitativen Verlauf der Umlagerung des O-Glycylserins zum N-Glycylserin keineswegs geschlossen werden darf, daß die Wanderung des Glycylrestes vom Stickstoff zum Sauerstoff in Lösung von pH 5 - 6 vernachlässigt werden kann. Eine direkte experimentelle Bestimmung der kinetischen und thermodynamischen Größen der $N \rightarrow O$ - Glycylwanderung ist mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht möglich, da in schwach saurer, (neutraler und basischer) Lösung das Gleichgewicht auf der Seite des N-Peptids liegt und in stärker saurer Lösung die Einstellung des zugunsten des O-Peptids verschobenen Gleichgewichts so stark verzögert ist, daß die intramolekulare Umlagerung durch die schnelle Hydrolyse des gebildeten O-Peptids verdeckt wird.

IX. Schlußbetrachtung.

Die widerspruchsfreie Darstellung der bei der Hydrolyse gewonnenen Versuchsergebnisse führt zu der Anschauung, daß Serinpeptide vom Typus X - Ser in saurer und neutraler Lösung (von pH 5 - 6) zum überwiegenden Teil über das O-Peptid hydrolysiert werden.

Die ungewöhnlich rasche Spaltung der Serinpeptide wird hierbei durch die nucleophile Reaktionsfreudigkeit der Hydroxygruppe des Serins begründet. Diese Reaktionsbereitschaft kommt durch die sich im kinetischen Zeitgesetz kundtuende Mitwirkung der Aminogruppe der benachbarten Aminosäure im Sinne einer allgemeinen Basenkatalyse zur Geltung.

Möglicherweise verläuft die durch gewisse proteolytische Enzyme katalysierte Hydrolyse nach einem ähnlichen Mechanismus, indem die Rolle jener Aminogruppe durch den Imidazolrest des Histidins übernommen wird.

Zusammenfassung.

Die Geschwindigkeitskonstanten der Spaltung des DL-Alanyl-DL-serins in Salzsäure wurden bei verschiedenen Temperaturen und verschiedenen Säurekonzentrationen ermittelt. Die hierbei anfallenden Hydrolysate wurden analysiert, indem die vor ihrer Spaltung geeignet mit ^{14}C markierten Peptide und Peptidbausteine chromatographisch und elektrophoretisch getrennt und auf Grund ihrer Radioaktivität quantitativ bestimmt wurden.

Die Hydrolyse verläuft bezüglich des Peptids und in Näherung bezüglich des Hydroniumions nach einem Zeitgesetz 1. Ordnung. Die Arrheniussche Aktivierungsenergie erweist sich als von der Ionenstärke unabhängig.

Unter den Bedingungen der Gefriertrocknung seiner schwach salzsauren Lösung wandelt sich das Alanylserin teilweise in das O-Alanylserin und in Depsipeptide um.

Nach dem geschilderten Verfahren wurden die kinetischen Daten der Hydrolyse des Glycyl-DL-serins in Wasser gemessen. Diese geschieht außerordentlich rasch nach einem Zeitgesetz 1. Ordnung bezüglich des Glycylserins.

Schließlich wurde die Kinetik der Umlagerung des wahrscheinlich bei der Hydrolyse intermediär auftretenden O-Glycyl-DL-serins zum Glycyl-DL-serin mit Hilfe einer potentiometrischen Methode untersucht. Die bei pH 6,1 und pH 5,6 vermessene Umlagerung ist von 1. Ordnung in bezug auf das O-Peptid und von -1,7. Ordnung in bezug auf das Hydroniumion.

Es wird ein Mechanismus diskutiert, nach dem der überwiegende Teil des Peptids vom Typus X-Serin über das O-Peptid gespalten wird. Auf die mögliche Analogie der Mechanismen der Serinpeptidumlagerung und der durch gewisse proteolytische Enzyme katalysierten Hydrolyse wird hingewiesen.

Bei der Darstellung der die Grundlage der Diskussion bildenden Theorie des Übergangszustandes wird auf den bei der Hydrolyse von Peptiden beobachteten Kompensationseffekt näher eingegangen.

Anhang

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Ala	Alanin
Ala-Ser	Alanylserin
C	Chromatographische Trennung des Hydrolysats
d	Tage
Dehyd. Ala-Ser	Dehydroxyalanylserin
Glyc	Glycin
Glyc-Ser	Glycylserin
h	Stunden
ipm	Impulse je Minute
M	Mittelwert
O-Peptid	O-Alanylserin bzw. O-Glycylserin
(H ⁺)	Konzentration der bei der O → N - Glycylwanderung gebildeten Säure nach der Zeit t,
(H ⁺) _∞	nach der Zeit unendlich; die Maßzahlen bezeichnen die wäh- rend der Zeit t bzw. ∞ zuge- setzte Menge 0,1 n Natronlauge in Vielfachen eines Viertel mm Kolbenvorschub; der innere Querschnitt der Kolbenbürette betrug 19,63 mm ² .
(HCl)	Konzentration der Salzsäure

I. Aktivitätsmeßwerte

Hydrolyse des Alanylserins in 1n Salzsäure

T °C	Zeit d	Ala ipm	Ala-Ser ipm	Depsi-+ O-Peptid ipm	Dehyd. Ala-Ser ipm	Gesamt akt. ipm	Ala-Ser %
32,0	0	0	9700	370	-	10070	100
	2,96	160	8700	290	-	9150	98,3
	2,96	140	8300	230	-	8670	98,4
	5,04	340	11500	560	-	12400	97,3
	5,04	370	11000	580	-	11950	96,9
	7,21	500	10300	460	-	11260	95,6
	7,21	580	11500	560	-	12640	95,4
	10,2	735	11900	640	-	13275	94,5
	10,2	700	11900	440	-	13040C	94,6
	13,3	900	11600	300	-	12800	93,0
	16,1	1100	11500	130	-	12730	91,4
	25,0	1670	10300	330	-	12300	86,4
	25,0	1700	11750	780	-	14230	88,1
	34,1	1980	9500	260	-	11740C	83,1
	46,0	2100	8300	100	-	10500	80,0
	46,0	2500	10200	450	-	13150C	81,0
	70,1	2860	7540	75	60	10535C	72,9

32,0	0						100
	116	2270	3315	-	-	5585	59,5
	116	2350	3200	-	-	5550	57,6
	117	2230	3070	-	-	5300	58,0
	117	2315	3410	-	-	5725	59,6
	119	2750	3250	-	-	6000	54,2
	119	2715	3340	-	-	6055	55,2
	121	2480	2950	-	-	5430	54,3
	121	2485	3170	-	-	5655	56,0
	142	3480	3065	-	-	6545	46,8
	142	3460	3365	-	-	6825	49,3

*) Aktivität ausnahmsweise in veredelten V2A-Schälchen bestimmt

Hydrolyse des Alanylserins in in Salzsäure - Forts.

T °C	Zeit d	Ala ipm	Ala-Ser ipm	Depsi-+	Dehyd.	Gesamt	
				O-Peptid ipm	Ala-Ser ipm	akt. ipm	Ala-Ser %
32,0	144	3400	3150	-	-	6550	48,2
	144	3450	3170	-	-	6620	47,9
	149	3180	2950	-	-	6130	48,3
	149	3270	2850	-	-	6120	46,6
=====							
36,9	0	0	8000	100	-	8100	100
	5,0	400	7640	660	-	8700C	95,4
	5,0	370	7530	470	-	8370	95,6
	11,2	785	7000	500	-	8285C	90,5
	11,2	855	7590	360	-	8805	90,3
	17,0	830	6200	510	-	7540	89,0
	17,0	1050	5950	660	-	7660	86,3
	22,1	1600	6100	540	-	8240	80,6
	22,1	1550	5600	910	-	8060	80,8
	25,1	1850	6760	190	-	8800	79,0
	25,1	1870	6475	400	-	8745	78,6
	28,2	2045	6150	600	-	8795	76,7
	28,2	1890	5750	440	-	8080	76,6
	31,0	1880	5520	180	-	7580	75,2
	33,1	2030	4980	190	-	7200C	71,8
	33,1	2350	6250	210	-	8810	73,3
	63,5	3780	4270	80	430	8560C	55,8
	63,5	3660	5050	70	-	8780	58,3
	69,5	3660	3990	250	300	8200C	55,3
	69,5	4270	4500	130	-	8900	52,1
=====							
41,6	0	400	6140	1070	-	7610	94,7
	0	425	7360	855	-	8640	95,1
	2,9	660	7360	300	-	8320	92,1
	2,9	690	7560	270	-	8520	91,9
	7,9	1200	6220	560	65	8045C	85,1
	7,9	1440	7110	500	-	9050	84,1
	13,8	1575	5800	150	35	7560C	79,2

Hydrolyse des Alanylserins in 1n Salzsäure - Forts.

T °C	Zeit d	Ala ipm	Ala-Ser ipm	Depsi-+ Dehyd.		Gesamt	
				O-Peptid ipm	Ala-Ser ipm	akt. ipm	Ala-Ser %
41,6	13,8	1760	6100	280	-	8140	78,4
	18,0	2280	4465	970	200	7915C	71,2
	18,0	2380	5450	690	-	8520	72,0
	21,8	2880	5630	55	80	8645C	66,7
	21,8	2800	5640	10	-	8450	66,8
	24,9	2865	4775	500	70	8210C	65,1
	24,9	3180	4790	425	-	8395	62,1
	27,7	3450	5170	190	280	9090C	62,0
	27,7	3440	5030	110	-	8580	59,9
	29,8	3070	4200	275	25	7570C	59,4
	29,8	3400	4930	120	-	8450	59,7

Hydrolyse des Alanylserins in 0,5n Salzsäure

32,0	0	0	7780	345	-	8125	100
	7,6	155	8500	300	-	8955	98,3
	7,6	165	8400	470	-	9035	98,2
	15,9	305	8100	265	-	8670	96,5
	15,9	315	8700	230	-	9245	96,6
	22,9	465	8600	300	-	9365	95,0
	22,9	460	8660	270	-	9390	95,1
	29,9	635	8000	530	-	9165	93,1
	29,9	625	8500	410	-	9535	93,4
	36,8	730	7980	460	-	9170	92,0
	36,8	735	8100	510	-	9345	92,1
	76,9	1050	5750	660	-	7460	86,0
	76,9	1330	6600	330	-	8260	83,9
	87,9	1450	6330	390	-	8170	82,3
	87,9	1280	5630	310	-	7220	82,3
	94,0	1430	6400	55	30	7915C	81,6
	94,0	1690	7260	320	-	9270	81,8
	129,5	2400	6580	100	440	9520C	70,1
	129,5	2440	7350	20	-	9810	75,2

Hydrolyse des Alanylserins in 0,5n Salzsäure - Forts.

T °C	Zeit d	Ala ipm	Ala-Ser ipm	Depsi-+ O-Peptid ipm	Dehyd. Ala-Ser ipm	Gesamt akt. ipm	Ala-Ser %
32,0	144,5	2135	6400	75	30	8640C	75,3
	144,5	2110	5630	90	-	7830	73,0
=====							
36,9	0	-	-	-	-	-	100
	6,7	203	8350	-	-	8553	97,6
	6,7	275	8700	-	-	8975	96,9
	13,8	420	7960	170	-	8550	95,1
	13,8	480	8200	110	-	8790	94,5
	20,7	735	7500	70	-	8305	91,2
	20,7	720	7730	-	-	8450	91,5
	27,8	1040	7500	810	-	9350	88,9
	27,8	1025	6600	1440	-	9065	88,7
	34,7	1160	7280	460	-	8900	87,0
	34,7	1235	7770	210	-	9215	86,6
	87,8	2650	5400	1140	250	9440C	71,9
	87,8	2300	4415	1130	-	7845	70,6
	93,8	2410	5600	50	560	8620C	72,0
	93,8	2880	6210	30	-	9120	68,4
	127,5	3500	4860	840	230	9430C	62,9
	127,5	3740	5020	200	-	8960	58,3
=====							
41,6	0	0	7450	380	-	7830	100
	4,75	250	8305	70	-	8625	97,1
	4,75	280	8165	100	-	8545	96,7
	9,7	505	7780	130	-	8415	94,0
	9,7	530	7640	90	-	8260	93,6
	13,6	820	7540	100	-	8460	90,3
	13,6	820	7940	100	-	8860	90,7
	16,7	840	6750	450	-	8040	89,6
	16,7	850	6900	550	-	8300	89,8
	20,7	1100	7360	80	-	8540	87,1
	20,7	1105	7025	80	-	8210	86,6
	26,0	1430	6630	130	-	8190	82,5

Hydrolyse des Alanylserins in 0,5n Salzsäure - Forts.

T °C	Zeit d	Ala ipm	Ala-Ser ipm	Depsi-+ Dehyd.		Gesamt akt. ipm	Ala-Ser %
				O-Peptid ipm	Ala-Ser ipm		
41,6	26,0	1425	6900	140	-	8465	83,2
	32,7	1610	6150	-	-	7760C	79,2
	46,3	2110	5200	910	-	8220C	74,3
	46,3	2200	5100	790	-	8090	72,8
=====							
44,9	0	-	-	-	-	-	100
	1,82	160	7680	570	-	8410	98,1
	1,82	150	6570	750	-	7470	98,0
	4,95	390	7600	640	-	8630	95,4
	4,95	390	7750	700	-	8840	95,6
	10,7	710	6900	580	150	8340C	91,5
	10,7	900	8150	230	-	9280	90,3
	15,6	1130	7260	330	-	8720	87,0
	15,6	(680)	7180	560	245	8665C	-
	25,8	1580	5200	880	200	7860C	79,9
	29,9	2010	5800	220	205	8235C	75,6
	29,9	2235	6575	145	-	8955	74,9
	32,9	2350	6200	120	50	8720C	73,0
	32,9	2380	6350	250	-	8980	73,5
	35,6	2660	6270	290	-	9220	71,1
=====							

Hydrolyse des Alanylserins in 0,6n Salzsäure

32,0	0	-	-	-	-	-	100
	16,0	200	4540	25	-	4765C	95,3
	16,0	160	4690	25	-	4875	96,3
	26,8	300	4970	23	-	5293C	93,9
	26,8	280	4720	15	-	5015	94,1
	194	1880	3000	-	-	4880	61,5
	194	1820	3080	-	-	4900	62,9
	198	2090	2900	-	-	4990	58,2
	198	1860	2790	-	-	4650	60,0
	206	1910	2800	-	-	4710	59,4

Hydrolyse des Alanylserins in 0,6n Salzsäure - Forts.

T °C	Zeit d	Ala ipm	Ala-Ser ipm	Depsi-+	Dehyd.	Gesamt	
				O-Peptid ipm	Ala-Ser ipm	akt. ipm	Ala-Ser %
32,0	206	2150	3120	-	-	5270	59,2
	287	2410	2610	15	-	5035	51,8
	287	2370	2500	-	-	4870	51,4
	297	2780	2270	10	-	5060	44,9
	297	2820	2320	-	-	5140	45,1

Hydrolyse des Glycyl-serins in reinem Wasser

T °C	Zeit h	Glyc ipm	Glyc-Ser ipm	Depsi-+ O-Peptid ipm	Gesamt akt. ipm	Glyc-Ser %
59,85	0	-	-	-	-	100
	45,6	270	5700	-	5970	95,5
	45,6	295	5600	-	5895	95,0
	116	510	4930	-	5440	90,6
	116	585	6750	-	7335	92,0
	183	1190	5410	-	6600	82,0
	183	1350	6650	-	8000	83,1
	259	1210	4580	-	5790	79,1
	259	1540	5100	-	6640	76,8
	332	2150	4910	-	7060	69,6
	403	1740	3950	-	5690	69,4
	403	2025	4000	-	6025	66,4
	499	2830	4350	-	7180	60,6
	499	2840	4125	-	6965	59,2
	669	4070	4120	-	8190	50,3
	669	4030	4150	-	8180	50,7
	831	4580	3290	-	7870	41,8
	831	4210	3110	-	7320	42,4
	1095	4580	2280	-	6860	33,2
	1095	5100	2525	-	7625	35,1

Hydrolyse des Glycyl-serins in reinem Wasser - Forts.

T °C	Zeit h	Glyc ipm	Glyc-Ser ipm	Depsi-+ O-Peptid ipm	Gesamt akt. ipm	Glyc-Ser %
70,25	0	-	-	-	-	100
	25,5	550	5560	560	6670	
	25,5	600	5600	600	6800	91,4M
	50,6	900	5260	-	6680	
	50,6	910	5170	520	6600	86,3M
	87,6	1890	5750	450	8090	
	87,6	2000	5950	470	8420	76,4M
	118,7	1760	4700	0	6460	
	118,7	1650	4200	0	5850	72,2M
	142	2560	4330	320	7210	
	142	2330	3810	300	6440	64,1M
	186	2260	3080	0	5340	
	186	2440	3300	0	5740	57,5M
	234	3275	2840	50	6165	
	234	2840	2620	100	5560	48,0M
	382	5200	2510	0	7710	
	382	5270	2510	0	7780	32,4M
	452	5670	1850	0	7520	
	452	5870	1880	0	7750	24,5M
	716	6620	720	90	7430	
	716	6170	675	90	6935	11,0M

78,5	0	0	6250	0	6250	100
	16,4	725	5670	300	6695	89,2
	16,4	835	6060	350	7245	88,5
	26,4	810	4420	300	5530	85,4
	26,4	1010	4500	300	5810	82,6
	41,7	1550	4200	200	5950	73,9
	41,7	1625	4700	250	6575	75,3
	52,0	2400	5175	200	7775	69,1
	52,0	2400	5800	200	8400	71,4
	70,3	2440	4200	200	6840	64,3
	70,3	2900	4300	200	7400	60,8

Hydrolyse des Glycyl-serins in reinem Wasser - Forts.

[illegible]

Hydrolyse des Alanyl-serins in reinem Wasser

T °C	Zeit h	Ala ipm	Ala-Ser ipm	Gesamt	
				akt.	
				ipm	
76,2	0	-	14000	14000	Zur Aktivi- tätsmessung veredelte V2A-Schäl- chen benutzt.
	64	6350	8000	14350	
	119	8690	4440	13130	
	185	8700	2370	11070	
	185	8940	2450	11390	
	212	-	1930	-	
	212	-	1860	-	
	240	-	1250	-	
	240	-	1680	-	
	284	-	905	-	
	284	-	980	-	

II. Meßwerte der Umlagerung des O-Glycylserins

pH	Zeit min	T = 22,04°C		T = 27,72°C	
		(H ⁺)	(H ⁺) _∞ - (H ⁺)	(H ⁺)	(H ⁺) _∞ - (H ⁺)
5,57	0	0	72,5	0	71,6
	8	3,0	69,5	7,7	63,9
	16	5,5	67,0	13,9	57,7
	24	8,0	64,5	19,5	52,1
	32	10,3	62,2	24,4	47,2
	40	12,7	59,8	28,9	42,7
	48	14,9	57,6	32,9	38,7
	56	17,0	55,5	36,5	35,1
	64	19,1	53,4	39,8	31,8
	80	22,9	49,6	45,5	26,1
	84			46,8	24,8
	92			49,2	22,4
	100			51,3	20,3
	108			53,2	18,4
	116			54,9	16,7
	120	31,3	41,2	-	
	124			56,4	15,2
	128	32,8	39,7		
	136	34,2	38,3		
	144	35,6	36,9		
	152	37,0	35,5		
	160	38,2	34,3		
	168	39,5	33,0		
	176	40,7	31,8		
		T = 32,38°C		T = 35,21°C	
		(H ⁺)	(H ⁺) _∞ - (H ⁺)	(H ⁺)	(H ⁺) _∞ - (H ⁺)
5,57	0	0	69,2	0	63,2
	4	6,3	62,9	8,9	54,3
	8	12,0	57,2	16,1	47,1
	12	17,0	52,2	22,3	40,9
	16	21,7	47,5	27,7	35,5

Meßwerte der Umlagerung des O-Glycylserins - Forts.

pH	Zeit min	T = 32,38°C		T = 35,21°C	
		(H ⁺)	(H ⁺) _∞ - (H ⁺)	(H ⁺)	(H ⁺) _∞ - (H ⁺)
5,57	20	25,9	43,3	32,3	30,9
	24	29,8	39,4	36,3	26,9
	28	33,3	35,9	39,8	23,4
	32	36,5	32,7	42,9	20,3
	40	42,1	27,1	47,7	15,5
	44	44,5	24,7	49,7	13,5
	48	46,7	22,5	51,3	11,9
	52	48,6	20,6	52,9	10,3
	56	50,3	18,9	54,1	9,1
	60	52,0	17,2	55,3	7,9
	64	53,5	15,7	56,3	6,9
	68	54,9	14,3		
	72	56,1	13,1		
=====					
		T = 12,09°C		T = 20,00°C	
		(H ⁺)	(H ⁺) _∞ - (H ⁺)	(H ⁺)	(H ⁺) _∞ - (H ⁺)
6,07	0	0	63,7	0	45,5
	8	2,7	61,0	9,1	36,4
	16	5,3	58,4	15,9	29,6
	24	7,6	56,1	21,3	24,2
	32	10,0	53,7	26,0	19,5
	40	12,0	51,7	29,4	16,1
	48	13,9	49,8	32,4	13,1
	56	15,9	47,8	35,1	10,4
	60	-	-	36,2	9,3
	64	17,7	46,0	-	-
	68	-	-	38,1	7,4
	76	-	-	39,8	5,7
	84	-	-	41,0	4,5
	92	-	-	42,1	3,4
	100	-	-	43,0	2,5
	128	29,4	34,3		
	136	30,7	33,0		

Meßwerte der Umlagerung des O-Glycylserins - Forts.

pH	Zeit min	T = 12,09°C		T = 20,00°C	
		(H ⁺)	(H ⁺) _∞ - (H ⁺)	(H ⁺)	(H ⁺) _∞ - (H ⁺)
6,07	144	32,0	31,7		
	152	33,1	30,6		
	160	34,2	29,5		
	168	35,2	28,5		
	176	36,3	27,4		
	184	37,2	26,5		
=====					
		T = 20,01°C		T = 24,18°C	
		(H ⁺)	(H ⁺) _∞ - (H ⁺)	(H ⁺)	(H ⁺) _∞ - (H ⁺)
6,07	0	0	64,5	0	64,2
	4	-	-	11,6	52,6
	8	10,6	53,9	20,4	43,8
	12	-	-	27,8	36,4
	16	18,8	45,7	33,8	30,4
	20	-	-	38,9	25,3
	24	25,8	38,7	43,0	21,2
	32	31,7	32,8	49,3	14,9
	36	-	-	51,7	12,5
	40	36,7	27,8	53,7	10,5
	44	-	-	55,3	8,9
	48	40,9	23,6	56,8	7,4
	52	-	-	58,0	6,2
	56	44,4	20,1	59,0	5,2
	64	47,5	17,0		
	72	50,0	14,5		
	80	52,2	12,3		
	88	54,0	10,5		
=====					
		T = 24,17°C		T = 27,45°C	
		(H ⁺)	(H ⁺) _∞ - (H ⁺)	(H ⁺)	(H ⁺) _∞ - (H ⁺)
6,07	0	0	47,0	0	66,0
	2,15	5,2	41,8	10,7	55,3
	4,15	9,0	38,0	18,9	47,1
	6,15	12,6	34,4	25,6	40,4

Meßwerte der Umlagerung des O-Glycylserins - Forts.

pH	Zeit min	T = 24,17°C			T = 27,45°C		
		(H ⁺)	(H ⁺) _∞	-(H ⁺)	(H ⁺)	(H ⁺) _∞	-(H ⁺)
6,07	8,15	15,6		31,4	31,3		34,7
	10,15	18,5		28,5	36,3		29,7
	12,15	21,0		26,0	40,4		25,6
	16,15	25,4		21,6	47,0		19,0
	20,15	29,0		18,0	51,9		14,1
	22,15	30,6		16,4	53,8		12,2
	24,15	32,0		15,0	55,3		10,7
	26,15	33,3		13,7	56,9		9,1
	28,15	34,5		12,5	58,1		7,9
	30,15	35,6		11,4	59,2		6,8
	32,15	36,5		10,5			
	36,15	38,2		8,8			
	40,15	39,8		7,2			
	44,15	40,9		6,1			
	48,15	42,0		5,0			
	52,15	42,8		4,2			

Lebenslauf

Als Sohn des Mittelschullehrers Alfons Heidberg und seiner Ehefrau Ruth, geb. Scholz, wurde ich, Joachim Heidberg, am 30. Januar 1933 in Breslau geboren. Ich habe noch zwei jüngere Geschwister.

Nach dem Besuch der Grundschule in Mährisch-Karlsdorf von September 1939 bis Juli 1942 und der Hauptschule in Mährisch-Rothwasser bis November 1942 trat ich im Dezember 1942 in die Oberschule für Jungen in Neu Oderberg ein, der ich bis zu ihrer Auflösung infolge Kriegseinwirkung im Januar 1945 angehörte. Nach der Vertreibung arbeitete ich bis Ende 1945 bei einem Bauern in Reckendorf im Bayerischen Wald. Von Ostern 1946 bis Juli 1950 war ich Schüler der Oberrealschule in Bayreuth. Im September 1950 in die Oberrealschule Ernestinum zu Coburg eingetreten, legte ich am 6. Juli 1951 die Reifeprüfung ab.

Anfang November 1951 begann ich das durch Werkarbeit finanzierte Studium der Naturwissenschaften an der Universität Erlangen.

Zum Sommersemester 1953 wurde ich mit dem Hauptfach Chemie und den Nebenfächern Physik und Mathematik an der Johann Wolfgang Goethe-Universität zu Frankfurt am Main immatrikuliert. Die Studienkosten brachte ich durch Werkarbeit auf. Im Sommersemester 1956 bestand ich das Vorexamen und im Sommersemester 1958 das mündliche Diplomhauptexamen. Von da ab arbeitete ich unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Hartmann im Institut für physikalische Chemie, wo ich eine Diplomarbeit mit dem Thema "Über die Darstellung, die chromatographische Verteilung, die Zonenelektrophorese und den Reaktionsablauf der Hydrolyse ^{14}C -markierter Serinpeptide" anfertigte, die ich am 1. Oktober 1959 abschloß. Anschließend widmete ich mich der Dissertation unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Hartmann.

Am 28. Oktober 1960 hielt ich auf einer Arbeitstagung der Gesellschaft Deutscher Chemiker in München einen Vortrag über

das Thema "Analytische Probleme bei Untersuchungen über die Kinetik der Spaltung niedermolekularer Peptide". Im Sommersemester 1961 nahm ich als Stipendiat an einem Ferienkurs über englische Sprache und Literatur im University College in Oxford teil.

Seit April 1959 gehöre ich der Studienstiftung des Deutschen Volkes an.

